

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



TESIS DOCTORAL

**Estudio de biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia anti
receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) en el
cáncer colorrectal metastásico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia Llovet Rodríguez

Directores

Eduardo Díaz-Rubio
Trinidad Caldés Llópis

Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE
RESPUESTA A LA TERAPIA ANTI RECEPTOR DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (ANTI-
EGFR) EN EL CÁNCER COLORRECTAL
METASTÁSICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Patricia Llovet Rodríguez

Directores:

Dr. Eduardo Díaz-Rubio

Dra. Trinidad Caldés Llopis

Madrid, 2014

El trabajo se ha realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid con el proyecto FIS PS09/0838 (2009-2011) con título: “Estudio retrospectivo multicéntrico de biomarcadores predictivos de eficacia en la terapéutica anti-EGFR en el CCRm con *KRAS* no mutado”.

AGRADECIMIENTOS

Porque “Es de bien nacidos ser agradecidos”.

A mi familia.

A Trinidad Caldés por su excelente y continua ayuda, y por su infinita paciencia.

Al profesor Díaz-Rubio por la oportunidad que me ha dado de poder trabajar en su FIS, del que ha salido este trabajo, y por su continuo apoyo.

A todos y a cada uno de mis compañeros del laboratorio de Oncología Molecular y de otros servicios (Inmunología, Análisis Clínicos, Oncología Clínica, Anatomía Patológica, Preventiva...no me quiero dejar a nadie así que daros todos por incluidos), por vuestra ayuda, compañía y ánimos que me habéis dado para que esta tesis haya sido una realidad: GRACIAS.

Y a todas las personas que me dejo y han estado a mi lado.

SUMMARY

Title: “Study of predictive biomarkers for response to anti epidermal growth factor receptor (anti-EGFR) in metastatic colorectal cancer”

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer in the world with around one million cases. Approximately fifty percent of the patients develop metastases. The natural history of metastatic colorectal cancer (mCRC) has been clearly modified in once the anti-EGFR monoclonal antibodies (cetuximab and panitumumab) have emerged in combination with the standard cytotoxic chemotherapy. However, the benefit from anti-EGFR is only confined to Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*)-wild type (*KRAS*-wt) colorectal tumors, while *KRAS*-mutated tumors do not respond to these drugs (1). This is the reason why it's necessary to know the *KRAS* status before treat the patient with an anti-EGFR. The 40% of colorectal tumors are *KRAS*-wt in 12 and 13 codon. Despite of the efficacy of anti-EGFR therapies, studied in different clinical assays, is detected only in approximately 60% of these *KRAS*-wt tumors (2). Then other biomarkers and molecular pathways must be involved in the response of the anti-EGFR therapies such as other downstream mutations in the MAPK pathway like K-Ras effector V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (B-Raf) and others in the alternative intracellular signaling pathways PIK3CA/PTEN/AKT and the EGFR ligands (amphiregulin and epiregulin) (3,4). The aim of the study is to test the hypothesis that the measurement of others biomarkers of the EGFR pathway are of interest in a selection of

patients with metastatic colorectal cancer receiving anti-EGFR in first-line chemotherapy. By this way, the expression and mutation of these biomarkers will be correlated with the clinical parameters of efficacy: response rate, progression-free survival (PFS) to progression and overall survival (OS).

Materials and methods: It is a retrospective study that included 107 patients that were treated in first line with an anti-EGFR with *KRAS* wild type status, in codons 12 and 13, in their tumors. *BRAF* and *PIK3CA* mutation status (wt or mutant [mt]) was determined from genomic DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue. We analyze V600E in *BRAF* by allelic discrimination using TaqMan probes designed by our group. The *PIK3CA* E542K, E545K/D in exon 9 and H1047R in exon 20 mutations were detected by real-time PCR using “*PIK3CA Mutation Test Kit*” (Qiagen). Amphiregulin (AREG) and epiregulin (EREG) expression was measured by real-time PCR using TaqMan Gene expression assays (Life Technologies Inc) on cDNA from RNA extracted from FFPE tumor tissue. Relative gene expression quantification was performed by triplicate according to the comparative Ct method using PSMB4 as endogenous control and a pool of cDNA from 10 colon tissue samples of healthy individuals as internal control. Terciles was used to determine the cut-off values to divide high and low expression.

Tumor response was evaluated by computed tomography scan. Criteria from RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) were used for the analysis. PFS was calculated from start of treatment to either progression of disease, death from any cause or last radiologic

assessment. OS was defined as the period from start of treatment until death.

Kaplan-Meier curves were used to analyze the PFS and OS. Associations between predictive factors and PFS or OS were examined using Cox proportional hazards regression models. All reported p-values are two-sided and not adjusted for multiple testing. χ^2 (Pearson) or Fisher's exact tests were used to assess differences between responders and non-responders for *BRAF*, *PIK3CA* mutation status, AREG and EREG mRNA expression.

Results: The median follow-up in our study was 15,8 months. Median PFS and OS were 8,4 and 20,3 months respectively. We find approximately 50% response for the anti-EGFR monoclonal therapy being the most common cetuximab, with 95% of the patients. 7,69% (8/104) harboured a *BRAF* mutation, and 10% (10/100) harboured *PIK3CA* mutation. AREG and EREG, were overexpressed in the tumors. PFS were significantly increased in patients with *BRAF* wild-type compared with *BRAF* mutated ($p=0,008$, HR: 2,7) and also in patients with high expression of AREG ($p=0,01$, HR 0,5) (Table 1). The OS was significantly higher in wt *BRAF* patients versus mutated *BRAF* ($p=0,007$, HR: 2,8) (Table 2). Patients with native *BRAF* and/or overexpressed AREG had better responses (Table 3).

Conclusion: Nowadays *KRAS* is the only biomarker whose mutational status is a predictive marker of response to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. In our study the patients that have a benefit are those with *BRAF*-wt (PFS and OS) and/or overexpression of amphiregulin (RR and PFS).

				PFS (months)		
<i>KRAS</i> wt patients n=107				8,4 months (95% CI 7,5-10,4)		
Feature	Patients population (n°)			Median (95% CI)	HR (95%CI)	p value
<i>BRAF</i>	n=96	Mutant	n=8	7,3 (1,9-8,4)	2,7 (1,2-5,7)	0,008
		Wt	n=88	8,8 (7,7-12,4)	1	
<i>PIK3CA</i>	n=92	Mutant	n=9	8,6 (0,5, NA)	0,8 (0,4-1,8)	0,627
		Wt	n=83	8,5 (7,4-11,1)	1	
<i>AREG</i>	n=74	Low	n=29	7,0 (2,8-7,7)	1	
		High	n=45	10,5 (7,9-12,8)	0,5 (0,3-0,9)	0,016
<i>EREG</i>	n=73	Low	n=44	7,7(5,6-8,8)	1	
		High	n=29	10,4(7,6-12,4)	0,9(0,5-1,5)	0,6
<i>BRAF</i> & <i>AREG</i>	n=66	Wt and low	n=23	7,0 (6,3-7,6)	1,7(0,9-3,0)	0,07
		Wt and high	n=43	11,1(6,9-15,2)	1	

Table 1: PFS according to *BRAF*, *PIK3CA* mutations status, *AREG* and *EREG* mRNA expression and some combination. Median (months). Hazard-Ratio (HR)

				OS (months)		
<i>KRAS</i> wt patients n=107				20,3 months (95% CI 15,5-25,9)		
Feature	Patients population (n°)			Median (95% CI)	HR (95%CI)	p value
<i>BRAF</i>	n=104	Mutant	n=8	8 (3,0-17,9)	2,8 (1,3-6,3)	0,007
		Wt	n=96	22,4(17,9-27,5)	12	
<i>PIK3CA</i>	n=92	Mutant	n=11	27,5 (5,4-NA)	0,7 (0,3-1,6)	0,409
		Wt	n=89	19,5 (12,7-25,9)	1	
<i>AREG</i>	n=74	Low	n=30	11,3 (7,5-25,5)	1	
		High	n=51	27,5 (17,9-39,7)	0,6 (0,3-1,0)	0,066
<i>EREG</i>	n=72	Low	n=50	25,5 (11,7-27,7)	1	
		High	n=30	22,1(11,7-41,1)	0,8(0,4-1,4)	0,4
<i>BRAF</i> & <i>AREG</i>	n=73	Wt and low	n=24	13,7(7,5-25,9)	1,6 (0,8-2,9)	0,1
		Wt and high	n=49	27,5(19,5-39,7)	1	

Table 2: OS according to *BRAF*, *PIK3CA* mutations status, *AREG* and *EREG* mRNA expression and some combination. Median (months). Hazard-Ratio (HR).

Variable	Categories	n	RR	95% CI	P value
BRAF	Mutated	8	1,8	1,3-2,6	0,059
	Wt	86	1		
PIK3CA	Mutated	9	1	-	-
	Wt	82	1		
AREG	Low	29	2,1	1,3-3,3	0,0027
	High	45	1		
EREG	Low	45	1,5	0,8-2,6	0,1
	High	28	1		
BRAF & AREG	Wt and low	23	2,15	1,2-3,7	0,006
	Wt and high	43	1		

Table 3: RR to *BRAF*, *PIK3CA* mutations status, AREG and EREG mRNA expression and some combination. Riesgo relativo (RR).

References

1. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol. 2009 Apr 20; 27(12):2091–6.
2. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zube A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. Ann Oncol. 2011 Jul; 22(7):1535–46.
3. Kuramochi H, Nakajima G, Kaneko Y, Nakamura A, Inoue Y, Yamamoto M, et al. Amphiregulin and Epiregulin mRNA expression in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. BMC Cancer. 2012 Mar 13; 12:88.
4. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010 Aug; 11(8):753–62.

ABREVIATURAS

5-FU: 5- Fluorouracilo

ADN: Ácido dextrirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

Anti-EGFR: *Anti- Epidermal growth factor receptor*

APC: *Adenomatous polyposis coli*

AREG: Anfirregulina

ARN: Ácido ribonucleico

ASCO: *American Society for Clinical Oncology*

BRAF: *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

B-Raf: Proteína del gen *BRAF*

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CCR: Cáncer colorrectal

CCRm: Cáncer colorrectal metastásico

CRD: Cuaderno de recogida de datos

DCC: Deleted in colon cancer

DPD: Dihidropirimidina deshidrogenasa

DTMP: Deoxitimidina-monofosfato

EE: Enfermedad estable

EGF: *Epidermal growth factor*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EMA: Agencia Europea del Medicamento

EORTC: Organización Europea para la investigación y tratamiento de cáncer

EP: Enfermedad progresiva

ERCC1: *Excision repair cross complementing 1*

EREG: *Epirregulina*

FdUMP: 5 Fluorodeoxiuridinamonofosfato

GAP: *GTPase Activating Protein*

GDP: Guanosin difosfato

GEFS: *Guanine-nucleotide Exchange Factor*

GTP: Guanosin trifosfato

HCSC: Hospital Clínico San Carlos

HNPCC: Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico

HR: Hazard-Ratio

HRAS: *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

IC: Intervalo de confianza

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

K-Ras: Proteína del gen *KRAS*

LV: Leucovorina

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MGB: Minor Groove Binder

MSI: Inestabilidad de secuencias microsatélite

MSI-H: Alta inestabilidad microsatélite

MSS: Estabilidad microsatélite

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

NCI: Instituto Nacional de Cáncer

NER: *Nucleotide excision repair*

NRAS: *Neuroblastome RAS viral*

NS: No significativo

NV: No valorable

PAF (o FAP): Poliposis Adenomatosa Familiar

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: *Phosphoinositide-3-kinase*

PIK3CA: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform

PSMB4: *Proteasome (prosome macropain) subunit, beta type, 4*

QPCR: PCR cuantitativa o a tiempo real

QT: Quimioterapia

Ras: proteínas de los genes *RAS*

RC: Respuesta completa

RNasa: Ribonucleasa

RP: Respuesta parcial

RR: Riesgo relativo

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

TGF- α : *Transforming growth factor-alfa*

TP53: *Tumor protein p53*

TS: Timidilato Sintetasa

TABLA DE CONTENIDOS

SUMMARY	i
ABREVIATURAS	vi
TABLA DE CONTENIDOS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer colorrectal: Epidemiología y diagnóstico de la enfermedad.....	1
1.2. Etiología del CCR: Carcinogénesis: Mecanismos moleculares	3
1.2.1. Alteraciones somáticas	4
1.2.2. El EGFR y el CCR	7
1.2.3. Ligandos del EGFR y transducción de señales	9
1.3. Clasificación del CCR	11
1.4. Tratamiento del CCR	13
1.4.1. Terapia clásica en el tratamiento del CCRm	14
1.4.2. Terapias dirigida: terapia anti-EGFR para el tratamiento del CCRm	16
1.5. Respuesta al tratamiento	19
1.6. Factores pronósticos de respuesta	19
1.6.1. Clínico-anatomopatológicos.....	20
1.6.2. Moleculares	20
1.7. Factores predictivos de respuesta y farmacogenómica	20
1.7.1. Factores pronósticos y predictivos en la terapia dirigida frente al EGFR.....	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1. Selección de pacientes	28
3.2. Seguimiento de los pacientes: CRD.....	29
3.3. Obtención de la muestra y estudio histológico	30
3.4. Extracción de ADN.....	30
3.5. Extracción de ARN.....	31
3.6. Cuantificación de ADN y ARN. Conservación de muestras	31
3.7. Obtención de ADNc a partir de ARN	32
3.8. PCR cuantitativa	33

3.9. Estado mutacional de <i>KRAS</i>	33
3.10. Estado mutacional de <i>BRAF</i>	34
3.11. Estado mutacional de <i>PIK3CA</i>	38
3.12. Amplificación del gen de β -actina para la confirmación de la retrotranscripción	38
3.13. Valoración de la expresión de AREG y EREG mediante QPCR.....	39
3.14. Análisis estadístico	44
4. RESULTADOS	47
4.1. Descripción del grupo de pacientes	47
4.2. Seguimiento de los pacientes	47
4.2.1. Demográfico y características tumorales	47
4.2.2. Supervivencia de los pacientes.....	48
4.2.3. Tratamiento anti-EGFR.....	51
4.2.4. Respuesta al tratamiento anti-EGFR	52
4.2.5. Estudio de SG en relación con la respuesta.....	53
4.3. Estudio de biomarcadores	54
4.3.1. Estudio de la mutación V600E en el gen <i>BRAF</i>	54
4.3.1.1. Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según el estado de <i>BRAF</i>	55
4.3.1.2. Estudio de SLP en relación al estado de <i>BRAF</i>	55
4.3.1.3. Estudio de SG en relación al estado de <i>BRAF</i>	56
4.3.2. Estudio de mutaciones en los exones 9 y 20 del gen <i>PIK3CA</i>	57
4.3.2.1. Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según el estado de <i>PIK3CA</i>	58
4.3.2.2. Estudio de SLP en relación al estado de <i>PIK3CA</i>	59
4.3.2.3. Estudio de SG en relación al estado de <i>PIK3CA</i>	59
4.3.3. Expresión relativa de AREG y EREG.....	60
4.3.4. AREG	62
4.3.4.1. Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según la expresión de AREG.....	63
4.3.4.2. Estudio de la SLP en relación a la expresión de AREG	64
4.3.4.3. Estudio de la SG en relación a la expresión de AREG	66
4.3.5. EREG	68

4.3.5.1. Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según la expresión de EREG	70
4.3.5.2. Estudio de la SLP en relación a la expresión de EREG	70
4.3.5.3. Estudio de la SG en relación a la expresión de AREG	72
4.3.6. Correlación entre AREG y EREG.....	74
4.4. Combinación de marcadores: <i>BRAF</i> y AREG	74
4.4.1. Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR.....	75
4.4.2. Estudio de la SLP.....	76
4.4.3. Estudio de la SG.....	79
5. DISCUSIÓN.....	82
5.1. Población estudiada	83
5.2. <i>BRAF</i>	85
5.3. <i>PIK3CA</i>	88
5.4. Anfirregulina y epirregulina	89
6. CONCLUSIONES.....	93
7. BIBLIOGRAFÍA.....	95

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cáncer colorrectal: Epidemiología y diagnóstico de la enfermedad*

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad que presenta una incidencia mundial de al menos un millón de casos anuales. Teniendo en cuenta a hombres y a mujeres, es la tercera causa más común de cáncer con un 9,8% de incidencia (Fig.1) (1,2).

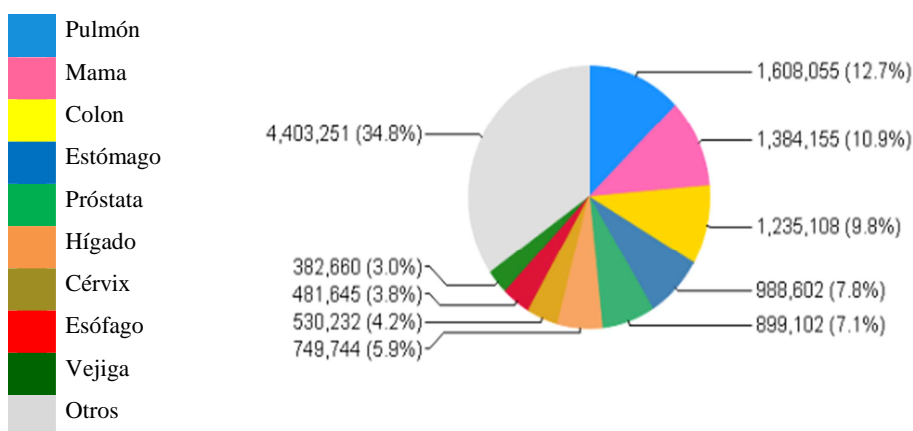


Figura 1: Datos epidemiológicos de incidencia del CCR a nivel mundial. El CCR representa el 9,8% de incidencia de cáncer a nivel mundial, colocándose en tercera posición tras el cáncer de pulmón y el de mama. Los datos de estimación de incidencia se indican en número absoluto y en porcentaje (1).

La incidencia, mortalidad y prevalencia a cinco años del CCR en Europa es del 13,7%, 12,1% y 14% respectivamente, valores ligeramente superiores que a nivel mundial. Esto es debido a que el 60% de los casos de dicha enfermedad, a nivel mundial, ocurre en zonas desarrolladas (1), por lo que se puede concluir que en su aparición tienen importancia los factores ambientales. En este sentido, se ha visto que el riesgo guarda correlación con la dieta baja en fibra y

rica en grasas animales (2). Se ha visto además que existe un mayor riesgo a desarrollarse en pacientes con hipercolesterolemia o cardiopatía isquémica.

Por otro lado, el CCR es una enfermedad que aumenta espectacularmente su incidencia a partir de los cincuenta años presentando una supervivencia global (SG) en cinco años del 55% aunque esto depende también del estadio tumoral (3).

En la práctica clínica el CCR se puede clasificar en tres grupos (Fig.2):

- CCR hereditario (5-6%), con una causa genética y molecular conocida. Se manifiesta en dos grandes síndromes: la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) y el Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC).

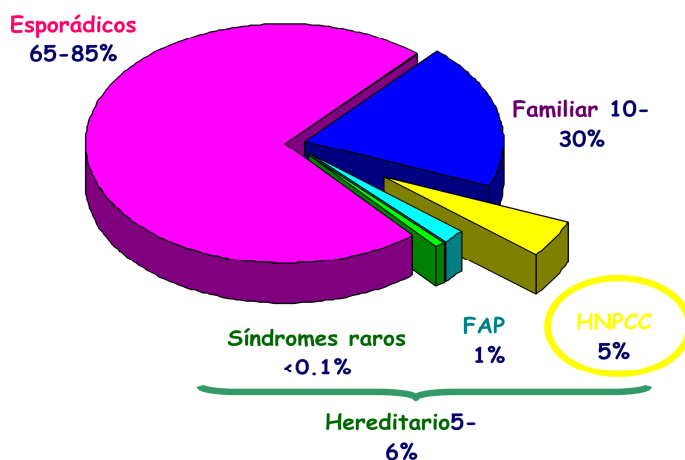


Figura 2: Distribución según el tipo de CCR. El CCR esporádico es el tipo más frecuente con un porcentaje entre el 65-85%. FAP o PAF, Poliposis adenomatosa familiar. HNPCC: Cáncer Colorrectal hereditario no polipósico.

- CCR familiar (10-30%), definido por la presencia de antecedentes familiares pero sin que se cumplan los criterios diagnósticos o moleculares de las formas hereditarias.
- CCR esporádico (65-85%), definido por la ausencia de antecedentes familiares

El diagnóstico precoz del CCR se facilita mediante la detección selectiva de sangre oculta en heces siendo la sensibilidad y especificidad de dicha técnica baja, en torno al 50% en ambos casos. La colonoscopia es otra prueba más sensible y específica que permite además obtener la biopsia del tumor y la extirpación de pólipos (2). Últimamente los objetivos se han centrado en prevenir dicha enfermedad, desarrollándose programas de cribado combinando estas dos técnicas en población de riesgo obteniéndose buenos resultados.

1.2. Etiología del CCR: Carcinogénesis: Mecanismos moleculares

El CCR es un buen modelo de carcinogénesis donde se ha establecido una secuencia de cambios genéticos correlacionados con etapas histológicas específicas de la progresión tumoral. Según el modelo de Vogelstein, que fue el primero que lo describió, el CCR es el resultado de la acumulación sucesiva de múltiples alteraciones genéticas, que incluyen tanto mutaciones activadoras de oncogenes (*KRAS*), como pérdidas o inactivaciones genéticas o epigenéticas de distintos genes supresores de tumores (*APC*, *DCC*, *TP53*) que participan en mecanismos de regulación de la proliferación, diferenciación, apoptosis y angiogénesis (4,5). Esto sucede en paralelo con una serie de cambios morfológicos clínicamente identificables, comenzando en fase de

pólipo adenomatoso y finalizando en el carcinoma invasor, proceso que puede durar hasta diez años (Fig.3). Este modelo se ha ido completando, según se ha ido profundizando en las alteraciones moleculares somáticas y germinales involucradas.

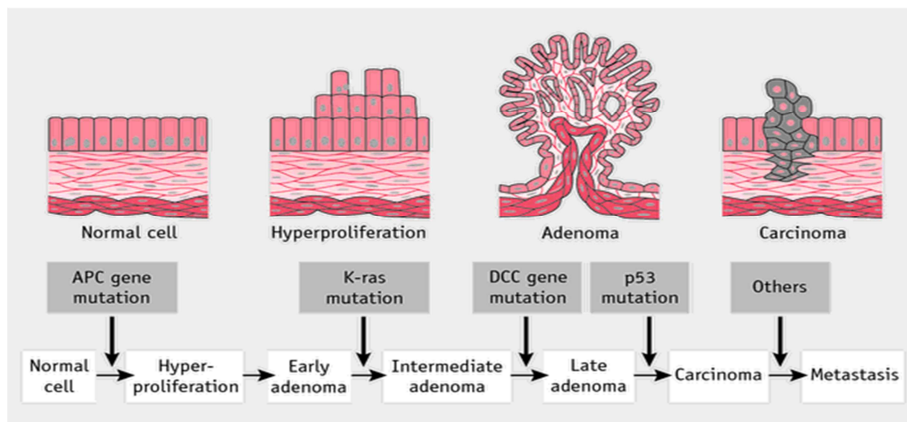


Figura 3: Alteraciones genéticas que dirigen el proceso de carcinogénesis colorrectal (6). Modelo basado en el modelo de Fearon y Vogelstein. A partir de un epitelio normal, debido a una secuencia de alteraciones se va modificando la mucosa, hasta la aparición del carcinoma.

1.2.1 Alteraciones somáticas

El cáncer es una proliferación clonal en el que las células tienen mutaciones que les confieren cierta ventaja frente a las células normales (7). Estas mutaciones ocurren en oncogenes y genes supresores de tumores (8). Las mutaciones somáticas ocurren durante la división de las células, normales y neoplásicas, debido a errores de la replicación o por compuestos exógenos mutagénicos. A su vez estas mutaciones se pueden clasificar en mutaciones “*drivers*”, que confieren ventajas a las células, y mutaciones “*passenger*”, que no están sujetas a la selección y no contribuyen a la oncogénesis (7).

Una de las vías de traducción de señales que se encuentra alterada en el CCR es la vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (ver 1.2.3). En esta cascada están implicados algunos protooncogenes y está desregulada en una alta proporción de todos los cánceres. En esta vía, *RAS* es uno de los genes involucrados. Los tres genes humanos *RAS* descritos son *HRAS* (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), *KRAS* (*Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*) y *NRAS* (*Neuroblastome RAS viral*). Las proteínas que producen, comúnmente llamadas Ras, pertenecen a la superfamilia de las GTPasas. Estas moléculas tienen unido guanosín difosfato (GDP) y son activadas por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (del inglés, *Guanine-nucleotide Exchange Factor* o GEFs) que permiten el intercambio de GDP con el pool de nucleótidos de guanina (en donde predomina el guanosín trifosfato o GTP). Así, la forma de Ras unida a GTP, activa una serie de proteínas situadas más adelante en la cadena de transmisión de señales hasta que la hidrólisis de GTP, mediada por la actividad intrínseca de Ras y gracias a la acción de otras moléculas que aceleran la reacción, las moléculas GAP (del inglés *GTPase Activating Protein*), devuelve el sistema al estado inicial (Fig.4) (9).

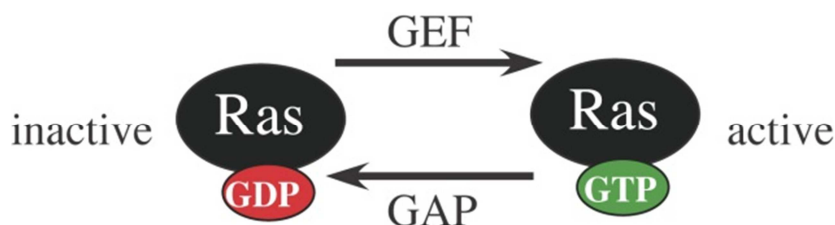


Figura 4: Proceso de regulación de las proteínas Ras (10). Ras se activa al intercambiar el GDP por el GTP gracias a moléculas GEF y se inactiva por la hidrólisis del GTP, que ocurre gracias a la actividad GTPasa de la propia proteína y a moléculas que aceleran esta reacción (del inglés, *GTPase Activating Protein* o GAP).

El gen *KRAS* (ENSG00000133703) está localizado en el brazo pequeño del cromosoma 12 (locus 12p12.1) y codifica la proteína K-Ras, de 189 aminoácidos y de 21656 Da. Mutaciones puntuales en este gen se han encontrado en un 30-50% de los CCR y parecen estar implicadas en la evolución de los adenomas de pequeños a grandes, ya que se presenta con mayor porcentaje en aquellos adenomas mayores a 1cm, por lo que supone mayor riesgo de malignización (13,14). Una mutación puntual en el gen *KRAS*, que provoca la sustitución de glicina por valina en la posición 12 de la proteína, fue la primera en identificarse en un oncogen humano (11). Hoy se sabe que las mutaciones puntuales que provocan activación de las proteínas Ras se agrupan en las regiones que codifican los aminoácidos 12, 13, 59, 61, 117 y 146. Un simple cambio en un nucleótido produce un aminoácido diferente y como consecuencia una proteína transformada y sin actividad GTPasa (12) por lo que la vía de señalización estaría en este caso constitutivamente activada.

Las moléculas Ras activan a una proteína, B-Raf, codificada por el gen *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) (ENSG00000157764) a su vez localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (locus 7q34). La proteína B-Raf pertenece a la familia de las serina-treonina quinasas. Se han descrito mutaciones en este gen asociadas a varios cánceres entre los cuales encontramos también al CCR.

1.2.2. El EGFR y el CCR

Entre los receptores de factores de crecimiento mejor caracterizados en neoplasias figuran los receptores de la familia ErbB (también conocidos como receptores tirosina-quinasa de tipo I). Esta familia está compuesta de cuatro receptores:

1. El EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*, ErbB1 o HER1)
2. ErbB2 o HER2
3. ErbB3 o HER3
4. ErbB4 o HER4

Los más estudiados han sido el EGFR (HER1) y el HER2, que fueron clonados y secuenciados en 1983 (15), y en 1985 respectivamente. En 1987 se consideró a HER2 sobreexpresado como factor de mal pronóstico en los tumores de mama. Por otro lado el EGFR es uno de los receptores más conocidos al haber abundantes pruebas que lo relacionan con la progresión de diversos tumores malignos (16). Todo esto hizo que comenzara el desarrollo clínico de tratamientos anti-ErbB (frente al EGFR y HER2).

El gen *EGFR* (ENSG00000146648) está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (locus 7p11.2). EGFR se expresa en células epiteliales, estromales, gliales y de músculo liso mediando el crecimiento, desarrollo y diferenciación (17). La expresión está elevada en amplio número de tumores estando descrito del 19% en tumores de CCR (18,19).

EGFR es una proteína que está localizada en la membrana plasmática y está compuesta por tres dominios, un dominio extracelular, que constituye el sitio de unión al ligando y el sitio que favorece la dimerización, en el cual se encuentra el grupo amino terminal; una región transmembrana, necesaria para el anclaje a la membrana, y el dominio intracelular, que posee la actividad tirosina quinasa y los sitios de unión a sustratos grupo carboxílico terminal (Fig.5).

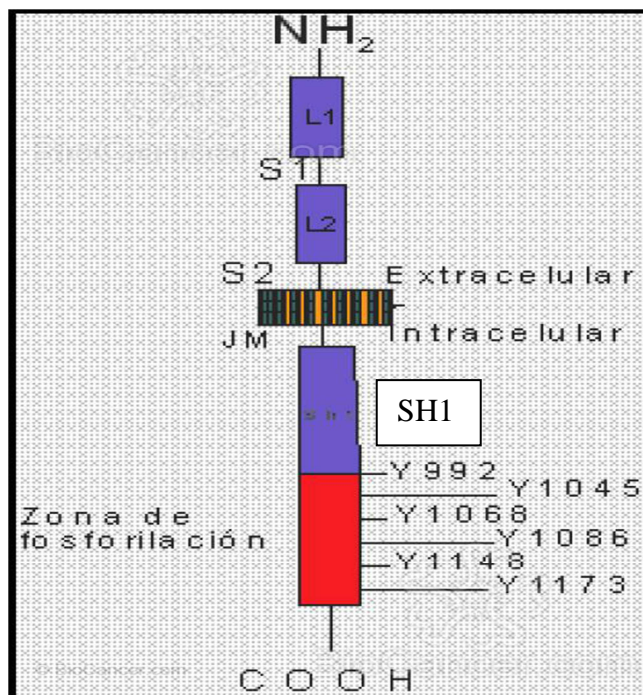


Figura 5: Estructura esquemática del monómero de EGFR. EGFR posee un dominio extracelular formado por dos subdominios de unión a ligandos (L1 y L2) y dos dominios ricos en cisteína (S1 y S2), del que S1 permite a EGFR la dimerización con un segundo receptor ErbB. SH1 es la región con actividad tirosina-quinasa y reside en el citoplasma celular, posee seis residuos tirosina disponibles para transfosforilación. El dominio transmembranal y el dominio juxtamembranal (JM) son necesarios para el anclaje a la membrana (20).

1.2.3. Ligandos del EGFR y transducción de señales

El EGFR en condiciones normales está inactivo necesitando de ligandos para su activación. Entre los ligandos del EGFR se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal growth factor*), el factor de crecimiento tumoral alfa (TGF α , *Transforming growth factor-alfa*), la anfirregulina (AREG), la epirregulina (EREG), la epigenina y la *heparin-binding* EGF. Alguno de estos a su vez puede interactuar con otros receptores de la misma familia de receptores (Fig.6).

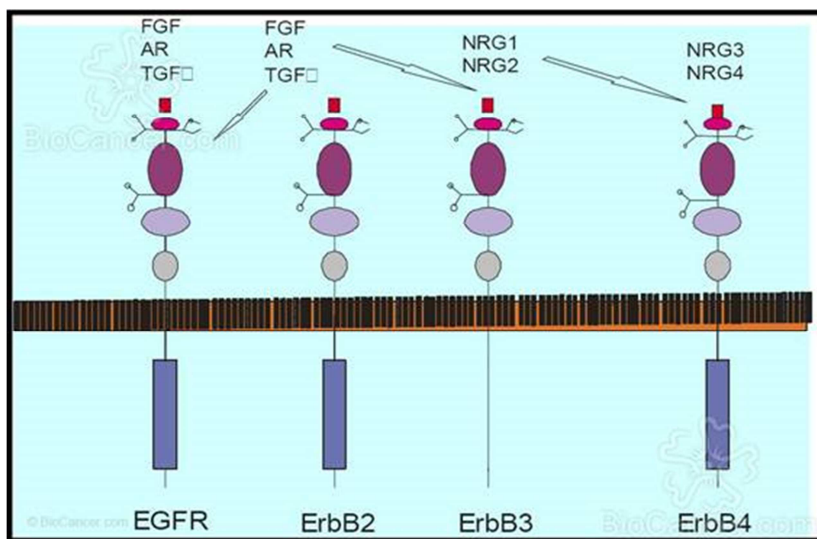


Figura 6: Receptores de la familia ErbB y ligandos. AR: anfirregulina.

Por la unión del ligando el monómero del EGFR homodimeriza o heterodimeriza, activándose así la actividad tirosina quinasa del dominio citoplasmático de las moléculas, autofosforilándose (Fig.7). La activación de la tirosina quinasa del receptor es el suceso clave que inicia la cascada de transducción de señales intracelulares dando lugar a oncogénesis (21,22). Las dos vías principales de señalización del EGFR son las que incluyen Ras-Raf-MAPK, relacionada con la proliferación

celular y la ruta PI3K-PTEN-AKT que controla la motilidad y la supervivencia celular (Fig.8) (23).

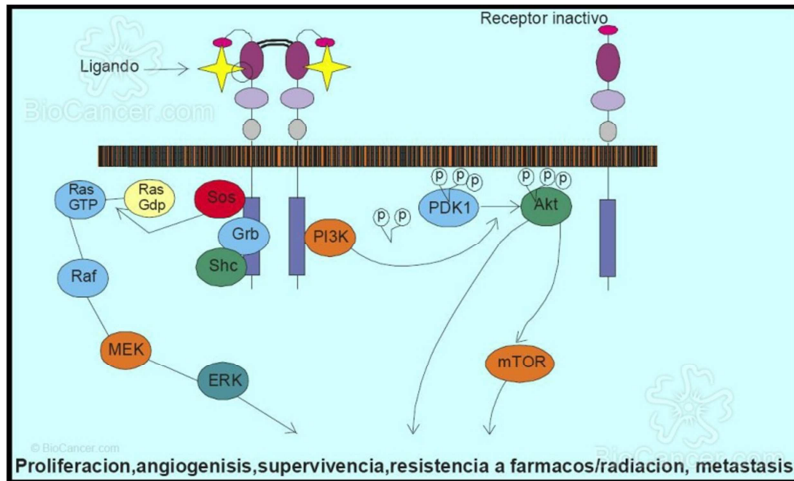


Figura 7: Dimerización del receptor EGFR y efecto. La dimerización del receptor supone la activación de las vías de transducción de señales. Se observan las dos vías principales de señalización del EGFR, la que incluye a Ras-Raf y la ruta PI3K-Akt dando lugar a proliferación, angiogénesis, supervivencia y metástasis.

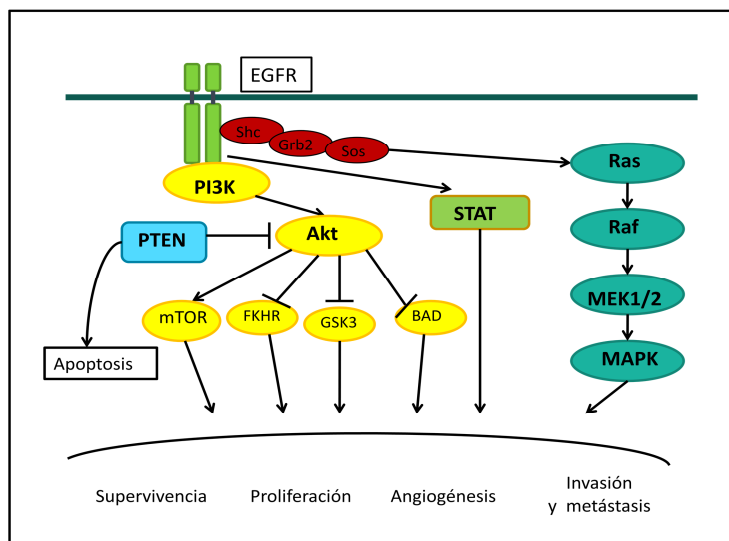


Figura 8: Esquema de las vías de señalización intracelular del EGFR. A través del receptor EGFR se producen señales de supervivencia, proliferación celular, angiogénesis e invasión y metástasis por la acción de tres vías, la de Ras, la de PI3K y la de STAT. La vía de PI3K a su vez es inactivada por PTEN produciéndose apoptosis.

1.3. Clasificación del CCR

Durante muchos años se ha utilizado la clasificación de Dukes, que clasifica a los CCR en estadios tumorales, que van desde el estadio A, limitándose este a la mucosa y a la submucosa, con SG a los 5 años mayores al 90%, hasta el estadio D con metástasis a distancia (hepáticas, pulmonares, óseas) con supervivencias del 5% a los 5 años (2). Actualmente hay consenso en la utilización de la clasificación TNM de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (24). Esta clasificación está hecha en función de criterios patológicos de invasión tumoral en el tejido afectado (T), invasión de los ganglios linfáticos regionales (N) y afectación metastásica, o fuera del órgano afecto (M). De esta forma, la clasificación TNM separa el CCR en cuatro estadios: I, II, III y IV. Como resumen, en la figura 9 se representa un dibujo de los cuatro estadios principales, con la afectación que conlleva cada uno de ellos.

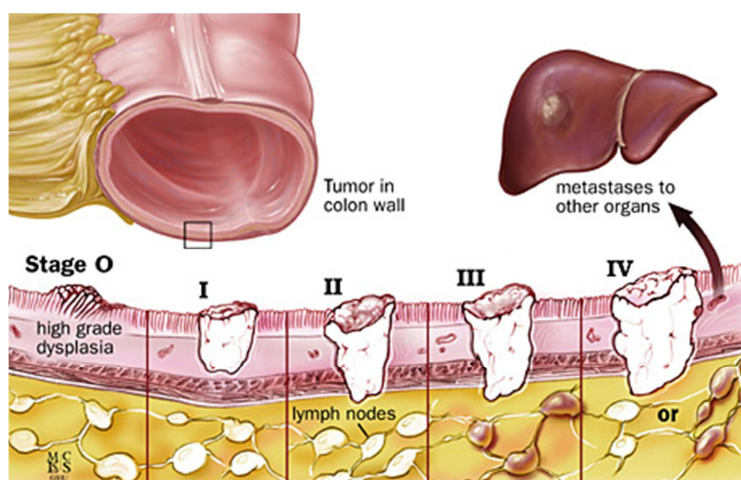


Figura 9: Representación gráfica de los diferentes estadios de CCR según la clasificación de la AJCC (25). Desde el menos avanzado, el 0, al IV, el tumor va aumentando de tamaño así como invadiendo más capas hasta la metástasis o invasión en otro órgano.

En la tabla 1 vemos un resumen de la relación entre ambas clasificaciones así como las características de cada estadio.

Clasificación de TNM				Clasificación de Dukes
Estadio	T	N	M	Estadio
0	Tis	N0	M0	-
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4a	N0	M0	B
IIC	T4b	N0	M0	B
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C
	T1	N2a	M0	C
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C
	T2-T3	N2a	M0	C
	T1-T2	N2b	M0	C
IIIC	T4a	N2a	M0	C
	T3-T4a	N2b	M0	C
	T4b	N1-N2	M0	C
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	D
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	D

Tabla 1: Clasificación del CCR según la AJCC y relación con la clasificación de Dukes. T: Tumor primario en donde Tis: carcinoma in situ, T1: invasión de la submucosa, T2: de la muscularis propia, T3: de los tejidos pericorreciales a través de la muscularis propia, T4a: invasión al tejido peritoneal, T4b: invasión o adherencia a otros órganos o estructuras. N: ganglios linfáticos regionales; N0 o no afectación, N1 de 1 a 3 siendo N1a, en 1, N1b de 2 a 3 y N1c sin afectación aunque con gran avance, hasta N2 en ≥ 4 afectados siendo N2a en 4 a 6 y N2b en más de 7. M: afectación metastásica, o fuera del órgano afecto, siendo M0 sin metástasis y M1 con ella diferenciándose M1a a un órgano y en M1b a más de un órgano. Tabla modificada de (24).

1.4. Tratamiento del CCR.

Estas clasificaciones dividen a los pacientes en diferentes grupos pronósticos y en base a esto se hace un tratamiento individualizado.

El 60-70 % de los pacientes afectados de CCR se diagnostican en estadios localizados, estadio II y III. En estos casos se realiza cirugía abierta de resección del tumor primario y de los ganglios linfáticos regionales. La cirugía puede ser curativa, no obstante, el porcentaje de recaídas es elevado, siendo la SG a 5 años del 60-80% en el caso de los pacientes en estadio II y del 30 al 60% en el estadio III. Precisamente, con la intención de reducir el porcentaje de recaídas, tras la cirugía, según el estadio tumoral, será necesario además aplicar un tratamiento con quimioterapia (QT) adyuvante consiguiendo aumentar así la SG de estos pacientes (27).

Un tercio de los pacientes presentan metástasis al diagnóstico pero, desgraciadamente, aproximadamente la mitad de los que se diagnostican en estadios precoces evolucionan a este estado en el transcurso de su enfermedad (28). En el manejo del paciente con CCR metastásico (CCRm), o en estadio IV, la estrategia terapéutica se basa en el manejo multidisciplinar del paciente (27). Hasta hace pocos años, la SG de un paciente diagnosticado de CCRm era de 6 meses. Con los grandes avances realizados en los últimos años y con la introducción de nuevos fármacos, esta SG ha aumentado hasta más de 20-25 meses. En la figura 10 se muestra una evolución de la aparición de las distintas terapias que se utilizan para el tratamiento de estos pacientes que han ayudado a mejorar su SG.

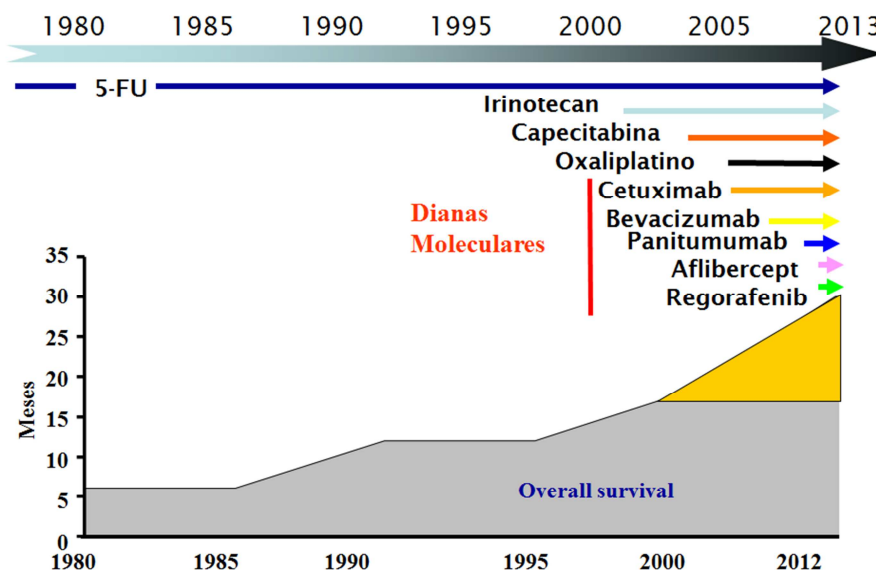


Figura 10: Agentes activos en el tratamiento de CCRm. En los últimos años han aparecido nuevos fármacos para el tratamiento del CCRm; los últimos, dianas moleculares, han mejorado la supervivencia de estos pacientes viéndose reflejado en la “Overall survival” o también llamada supervivencia global (SG).

1.4.1. Terapia clásica en el tratamiento del CCRm

Durante más de 40 años, el pilar de la QT para el cáncer de colon avanzado ha sido el uso de las fluoropirimidinas, siendo el **5-fluorouracilo (5-FU)** el estándar de tratamiento para la mayoría de los tumores sólidos. El principal mecanismo de acción de este compuesto consiste en la inhibición competitiva de la timidilato sintetasa (TS) a través de su conversión intracelular a su principal metabolito activo, el 5-fluorodeoxiuridina-monofosfato (FdUMP) (Fig.11). Otra enzima de gran relevancia en el metabolismo del 5-FU es la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), que cataboliza la inactivación del 5-FU en el hígado.

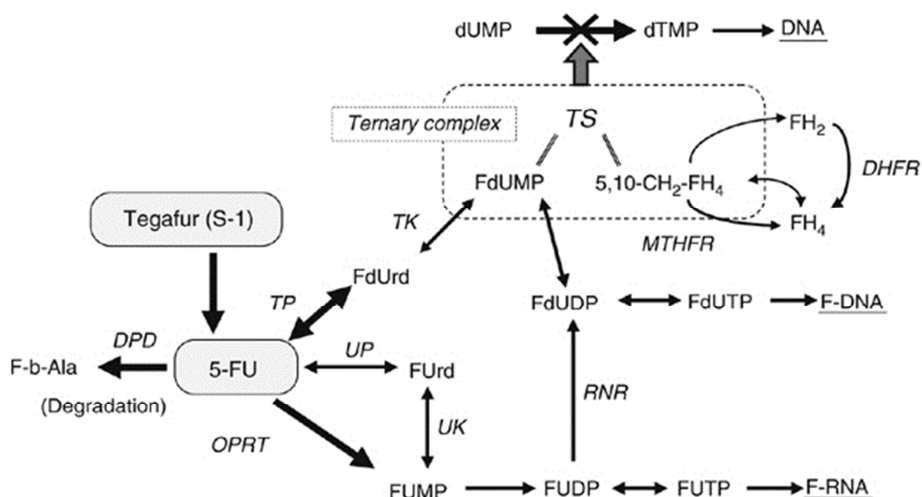


Figura 11: Mecanismo de acción del 5-FU. El 5-FU, a través de uno de sus metabolitos, el FdUMP, inactiva la Timidilato Sintasa (TS) inactivándose la producción de Deoxitimidina-monofosfato (dTMP) necesaria para la síntesis del ADN.

El 5-FU se da en infusión continua o en bolus por lo que una alternativa es usar fluoropirimidinas orales, siendo la Capecitabina (Xeloda®) el fármaco comercializado con estas características.

En la Tabla 2 se muestran algunas combinaciones comercializadas con fluoropirimidinas que se utilizan en la actualidad (27).

Nombre	Fármacos
FOLFOX	Oxaliplatino Leucovorina (LV) 5-fluorouracilo (5-FU)
XELOX	Oxaliplatino Capecitabina (5-FU)
FOLFIRI	Irinotecán Leucovorina (LV) 5-fluorouracilo (5-FU)

Tabla 2: Combinación de terapias de QT. Se indica el nombre así como los componentes de los que consta la terapia combinada.

Tras estos fármacos, aparece el **irinotecán**, un inhibidor de la topoisomerasa 1 comercializado como Camptosar®.

La introducción del **oxaliplatino** en la QT de tumores colorrectales metastáticos también ha representado un avance significativo en la lucha contra esta enfermedad. El mecanismo de acción es la formación de aductos con el ADN inhibiendo su replicación. Este tipo de daño en el ADN es reparado por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos *nucleotide excision repair* (NER). La enzima *excision repair cross complementing 1* (ERCC1) forma parte del complejo y juega un papel fundamental en la escisión del fragmento de ADN dañado.

Otro fármaco que se utiliza es la **leucovorina (LV)**, también conocido como ácido folínico. Es un derivado del ácido tetrahidrofólico por lo que se utiliza como adyuvante en combinación con el 5-FU para ampliar su espectro de acción actuando como modulador bioquímico de este compuesto (29).

1.4.2. Terapias dirigidas: Terapia anti-EGFR para el tratamiento de CCRm

En los últimos años gran parte del esfuerzo en investigación oncológica se ha enfocado en la identificación de dianas terapéuticas específicas de las células tumorales para conseguir bloquear vías esenciales para el crecimiento tumoral. Con estos nuevos tratamientos dirigidos se pretende potenciar el efecto antitumoral del tratamiento quimioterapéutico, así como minimizar los efectos secundarios de los

tratamientos asociados a la baja especificidad de la QT estándar.

Debido a la importancia que se le ha dado al papel del EGFR en la tumorigénesis, este receptor se ha convertido en una prometedora diana terapéutica para los agentes anticancerosos (30). Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el bloqueo del EGFR y de su cascada de señalización permite inhibir el crecimiento tumoral y de ese modo los pacientes pueden obtener beneficios terapéuticos. De las estrategias que se han abordado para inhibir el EGFR así como la señal *downstream* que producen caben destacar dos:

- El bloqueo con anticuerpos monoclonales, que se unen con alta afinidad al dominio externo del receptor compitiendo con los ligandos endógenos del receptor. Frente al EGFR tenemos los fármacos **cetuximab**, molécula quimérica recombinante, (IMC-225, Erbitux®, Merk, Milan, Italia) y **panitumumab**, molécula humana, (ABX-EGF, Vectibix®, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) que actúan como antagonistas del receptor (Fig.12).
- Inhibición de la actividad enzimática tirosina-quinasa del receptor a través de pequeñas moléculas inhibidoras. Estas previenen la autofosforilación del dominio tirosina-quinasa intracelular del receptor.

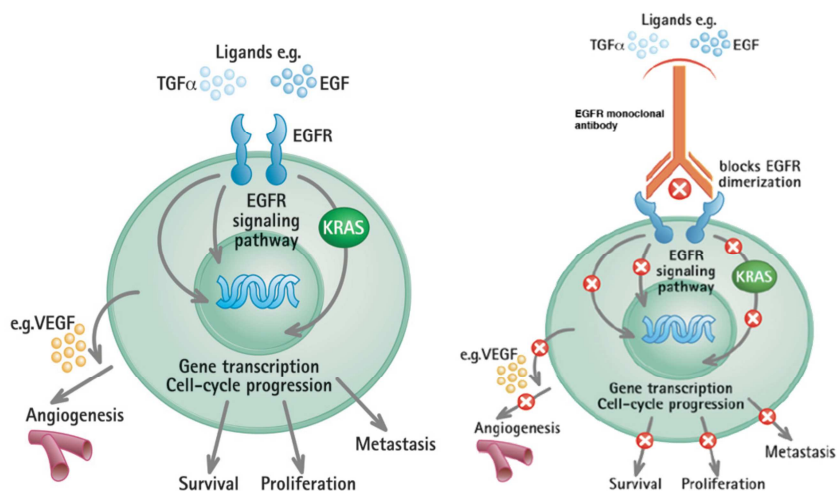


Figura 12: Mecanismo de acción a través de EGFR y bloqueo de la vía a través de un anticuerpo monoclonal específico. Izquierda: Las vías de señalización a través de EGFR, están activadas por la acción de los ligandos (EGF y TGFα). **Derecha:** Debido a la acción del anticuerpo monoclonal anti-EGFR sobre el receptor todas las cascadas de señalización downstream se inhiben.

Cetuximab y panitumumab inicialmente se aplicaron en pacientes refractarios a otras terapias, mostrándose efectivos tanto en monoterapia, con unas tasas de respuesta entre el 8 y 10% (31,32), como en combinación con otros tratamientos, como el irinotecán, con unas tasas de respuesta superiores al 20% (33), sugiriendo un efecto restaurador de la quimiosensibilidad en pacientes que ya habían progresado a irinotecán.

Actualmente ambos fármacos, están aprobados para el tratamiento del CCRm en primera línea en combinación con QT y en monoterapia en casos en los que falla el oxaliplatino o el irinotecán o exista intolerancia frente al irinotecán. Como efectos secundarios más comunes producen debilidad, malestar y fiebre no apareciendo estos efectos en todos los pacientes y siendo además reversibles, desapareciendo, cuando cesa de administrarse el tratamiento.

1.5. Respuesta al tratamiento

En Febrero del 2000 se definieron los criterios RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), que se emplean para la evaluación de la respuesta al tratamiento en tumores sólidos. Estos criterios fueron revisados posteriormente, en 2009, saliendo la nueva versión, nombrada 1.1. Estos criterios son unas reglas, definidas por consenso internacional entre la Organización Europea para la investigación y tratamiento de cáncer (EORTC), el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) de los EEUU y el Instituto Nacional de Cáncer de Canadá, que definen si el paciente mejora (responde), permanece igual (estable) o empeora (progresar) con el tratamiento. De esta forma, los pacientes que inician un tratamiento de primera línea esta se mantendrá mientras exista respuesta o estabilización de la enfermedad y no aparezcan efectos secundarios intolerables que provoquen su suspensión. El fallo de dicho tratamiento, o progresión de la enfermedad, indicará el cambio de tratamiento a segunda línea, manteniéndose los mismos criterios que en el tratamiento de primera línea, y así sucesivamente (27).

1.6. Factores pronósticos de respuesta

Un factor pronóstico nos da información de la evolución de un paciente. Los factores pronósticos nos ayudan a alcanzar una relación óptima entre el posible beneficio que ofrecemos al paciente con el tratamiento y el coste que éste supone en calidad de vida, debido a los efectos secundarios. De hecho, es el conjunto de los factores pronósticos de un paciente determinado lo que nos ayudará a elegir

diferentes alternativas terapéuticas que a ese enfermo en concreto se le pueden ofrecer (34). El estudio de factores pronósticos es la base sobre la que se fundamenta la personalización de la terapéutica.

1.6.1. Clínico-anatomopatológicos

El mejor índice pronóstico aislado del cáncer de colon es el grado de invasión en el momento de la cirugía, es decir el estadiaje TNM. Además de este debemos considerar otros factores como son el número de ganglios resecados, la enfermedad residual, el grado histológico, el tipo histológico, la presentación clínica, etc.

1.6.2 Moleculares

La inestabilidad de microsátélites es uno de ellos, presentandose tumores con alta inestabilidad (MSI-H), con mejor pronóstico a largo plazo comparados con tumores estables (MSS) del mismo estadio (35).

La pérdida alélica de 18q, región en la que se encuentra el gen “*deleted in colon cancer*” (*DCC*), implicado en la apoptosis, está asociada a mal pronóstico.

Otros factores pronósticos son las mutaciones en el gen *TP53* y los niveles séricos del antígeno carcinoembrionario (CEA)

1.7. Factores predictivos de respuesta y farmacogenómica

Los factores predictivos tienen relación con la respuesta al tratamiento,

de forma que nos van a indicar si el tratamiento va a ser más o menos eficaz en presencia de los mismos. La búsqueda de predictores de respuesta, puede llevarnos también a la posibilidad de un tratamiento individualizado en función de las características genéticas del tumor y del paciente, buscando en definitiva un aumento en la tasa de respuestas y supervivencia.

La farmacogenómica se basa en la aplicación de la tecnología genómica en el desarrollo de fármacos usando marcadores biológicos para predecir la respuesta de un paciente de forma individualizada. También estudia el efecto de los distintos fármacos en la variación genética sobre toxicidad, eficacia y metabolismo de fármacos (Fig.13).

En definitiva, la idea es establecer, tras el diagnóstico anatomopatológico, el perfil molecular de cada paciente, el pronóstico y la mejor opción terapéutica (34).

La investigación translacional llevada a cabo en los últimos años ha permitido identificar una serie de características genéticas específicas de cada tumor, lo cual ha supuesto el desarrollo de fármacos dirigidos contra dianas moleculares específicas. Esto ha permitido mejorar las expectativas de supervivencia de los pacientes así como su calidad de vida.

Por otro lado esto supone un importante ahorro gracias a la selección de pacientes y tratamientos, permitiendo optimizar no solo los tratamientos de cada enfermo sino los recursos económicos del sistema. Personalizar la atención oncológica podría conducir a una mayor

eficiencia de los ciclos de tratamiento y la incorporación de biomarcadores a los estudios farmacoeconómicos contribuiría sin duda a dilucidar la mejor forma de garantizar la sostenibilidad del sistema nacional de salud.

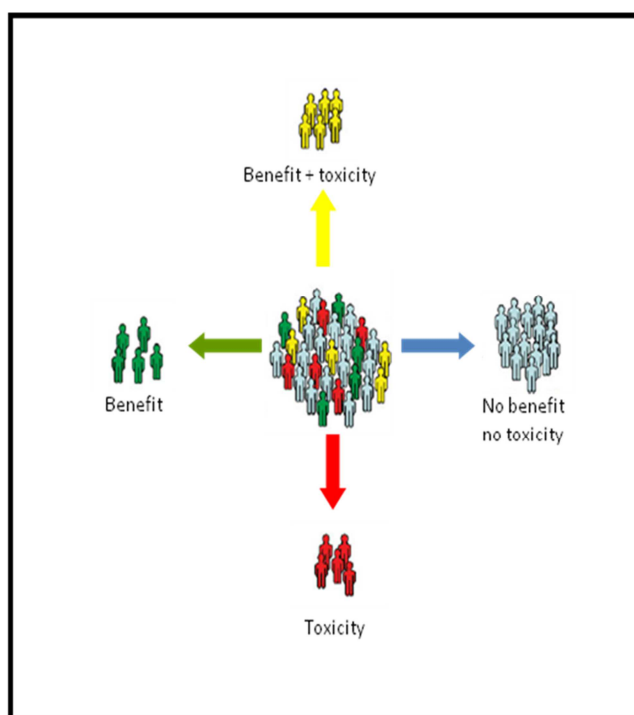


Figura 13: Selección de pacientes para el tratamiento individualizado. En una población se busca clasificar aquellos que se beneficiarán del tratamiento de los que no se benefician.

1.7.1. Factores pronósticos y predictivos en la terapia dirigida frente al EGFR

Inicialmente, las terapia dirigidas frente al EGFR, como son el cetuximab y el panitumumab, fueron exclusivamente desarrolladas en tumores que expresaban EGFR en la superficie celular (36). Posteriormente se observó que la respuesta a estos fármacos no

guardaba una buena correlación con la expresión de EGFR. De hecho, se han documentado tasas de respuesta de hasta el 25% en tumores EGFR-negativos (4–6).

Por otro lado, aproximadamente el 40% de los pacientes con CCR presentan mutación somática tumoral en el exón 2 del gen *KRAS* estando localizada el codón 12 ó 13, localizados. Amado et al fue el primero en demostrar la hipótesis, dentro de un ensayo clínico, en el que comparaba el tratamiento de panitumumab frente al mejor cuidado de soporte, que únicamente los pacientes que no presentaban una mutación para el gen *KRAS* (*KRAS* nativos o también llamado WT, del inglés wild-type) se beneficiaban de este tratamiento (37). Los estudios clínicos CRYSTAL y OPUS habían evaluado el papel de cetuximab en el tratamiento de CCRm con QT basada en irinotecán y oxaliplatino respectivamente. Los datos aportados por Amado et al obligaron a realizar en ambos estudios el análisis retrospectivo del *KRAS* de los pacientes incluidos confirmando que el beneficio del tratamiento con cetuximab se limitaba a los pacientes sin mutación del *KRAS* (37–39). De esta forma ya en Febrero del 2009, la American Society for Clinical Oncology (ASCO) recomendó el empleo de estos fármacos a la subpoblación de pacientes con *KRAS* nativo por ser factor pronóstico. Posteriormente se unió también la Agencia Europea de medicamentos (EMA) y la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) al haberse demostrado en ensayos independientes que pacientes con mutaciones en el codón 12 y 13 de *KRAS* en el tumor no respondían al tratamiento anti-EGFR confirmando su valor predictivo (24,40). La mutación haría que la cascada de señalización estuviera activada

constitutivamente no haciendo efecto el anti-EGFR ya que se trata de un bloqueo de la vía por encima de la mutación (41,42).

A pesar de estos resultados no todos los pacientes *KRAS* nativos presentan respuesta o incremento en la supervivencia tras recibir tratamiento anti-*EGFR*, siendo esta del 60% aproximadamente, por lo que es de crucial importancia la identificación de otros marcadores responsables de la respuesta anti-*EGFR*. Hoy en día se están realizando estudios en los que se incluye a algunos de los genes, *downstream* de Ras (B-Raf/MEK/MAPK), o en otras vías de señalización del EGFR, como la vía PI3K/PTEN/AKT, así como el estudio de expresión de los ligandos del EGFR, la *AREG* y la *EREG* como moléculas implicadas en la respuesta y progresión de los pacientes con CCRm tratados con anti-EGFR.

B-Raf es principal efector de K-Ras formando parte de la vía de señalización MAPK/ERKs afectando a la división celular, la diferenciación y la secreción. Mutaciones en el gen han sido asociadas con varios cánceres como linfoma no-Hodgkin, CCR, melanoma maligno, carcinoma de tiroides, carcinoma de células escamosa de pulmón, y adenocarcinoma de pulmón. La mutación más frecuente es la localizada en el codón 600 que consiste en una transversión de una A>T produciendo una mutación de cambio de sentido (V600E) en un codón que está localizado en el dominio quinasa. Este fue el primer biomarcador, tras el *KRAS*, que se estudió para buscar otras causas de la ineficacia de estos fármacos en estos pacientes. Se han publicado unos cuantos trabajos buscando la relación entre el estado mutacional del gen y la respuesta de pacientes de CCRm tratados con anti-EGFR

(38,39,43,44) aunque en la actualidad, las guías clínicas NCCN lo consideran como opcional pero no necesario para tratar con un anti-EGFR en pacientes con CCRm siendo solo considerado como factor de mal pronóstico.

Otro biomarcador en estudio es PIK3CA también es responsable de coordinar funciones celulares, a través de la vía de señalización PI3K-PTEN-AKT, activada por EGFR, como proliferación celular, degranulación, migración celular y transportes vesiculares. El gen *PIK3CA* (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform) está localizado en el brazo pequeño del cromosoma 11 (locus 11p15.5-p14) y codifica una fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) de la clase II formada únicamente por una subunidad catalítica. Dicha proteína, de 1068 aminoácidos con 124284 Da (45), pertenece a la familia de las quinasas capaces de fosforilar el 3'OH del anillo inositol de los fosfoinositoles.

Por otra parte, se ha postulado en algunos trabajos la sobreexpresión de ligandos endógenos del *EGFR*, como la *AREG* y la *EREG*, como biomarcadores o factores que pueden condicionar también la respuesta (46-48). Ambos genes no se expresan en tejido normal del colon (39).

El gen de la *AREG*, ENSG00000109321, está localizado en el brazo largo del cromosoma 4 (locus 4q13-q21). Produce una glicoproteína de 252 aminoácidos de un paso de membrana miembro de la familia de los factores de crecimiento. Es un factor de crecimiento autocrino y mitógeno para astrocitos, células de Schwann y fibroblastos. Interactúa con el receptor EGF/TGF- α promoviendo el crecimiento de células

epiteliales e inhibe el crecimiento de ciertas líneas celulares malignas carcinoides. El gen de la *EREG*, ENSG00000124882, está localizado en el brazo largo del cromosoma 4 (locus 4q13.3) y la proteína que codifica, tiene un tamaño de 169 aminoácidos con 19044 Da. Al igual que la AREG, es un miembro de la familia del EGF. Actúa en células epiteliales y mesenquimáticas a través de EGFR. Además de funcionar como ligando del EGFR lo hace de la mayoría de miembros de la familia de los ErbB (50).

Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se analiza la implicación de otras mutaciones en *KRAS*, así como en *NRAS*, otro miembro de la familia Ras, en la respuesta a los anti-EGFR en pacientes con CCRm (51). Estas mutaciones estarían presentes entorno al 10% de los pacientes con *KRAS* nativo y como consecuencia de estos resultados se están cambiando las guías americanas y europeas de práctica clínica de Oncología que guían el tratamiento de estos pacientes.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: Determinar si el estatus de los biomarcadores que intervienen en la señalización del EGFR es útil para seleccionar a aquellos pacientes con CCRm que van a responder al tratamiento anti EGFR.

Objetivos:

- Seleccionar una población homogénea de pacientes con CCRm tratados con QT y un anti-EGFR en primera línea que presenten *KRAS* nativo.
- Determinación del estado mutacional de moléculas implicadas en la vía de señalización de EGFR como son *BRAF* y *PIK3CA*.
- Determinación de la expresión de los ligandos del EGFR, anfirregulina (AREG) y epirregulina (EREG).
- Establecer la importancia pronóstica y predictiva de dichos marcadores, *BRAF*, *PIK3CA*, AREG y EREG a través de la relación con las variables clínicas:
 - Respuesta clínica medida en riesgo relativo (RR).
 - Supervivencia libre de enfermedad (SLP).
 - Supervivencia global (SG).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de pacientes

El estudio comienza en el año 2009 con el proyecto FIS PS09/00838 “Estudio retrospectivo multicéntrico de biomarcadores predictivos de eficacia en la terapéutica anti-EGFR en el CCRm con *KRAS* no mutado”.

El estudio multicéntrico comprende 10 hospitales (Tabla 11), entre ellos el nuestro, el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC). La mayoría de ellos mandaron el bloque tumoral del paciente al laboratorio para la determinación de *KRAS* necesaria previa a la administración del fármaco anti-EGFR. Solo en unos pocos esta determinación se había realizado en sus respectivos centros.

Posteriormente se seleccionaron pacientes diagnosticados de CCRm cuyos tumores tuvieran *KRAS* nativo y que hubieran recibido un tratamiento en primera línea basado en un anticuerpo monoclonal contra el EGFR, cetuximab o panitumumab, en combinación con otro fármaco quimioterapéutico.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para poder ser incluidos en este estudio.

3.2 Seguimiento de los pacientes: CRD

Se extrajeron datos clínicos de las historias clínicas de los pacientes para rellenar los cuadernos de recogida de datos (CRD). Las variables clínicas de interés se detallan en la Tabla 3.

Parámetros de estudio incluidos en el CRD	
Parámetro	Escala
Demográfico	
Fecha de nacimiento	Fecha
Sexo	Mujer/Varón
Éxito	Si/No
Fecha de éxito/perdida de seguimiento	Fecha
Tumor y tratamiento previo	
Localización del tumor primario	Colon, recto o ambos
Nº de localizaciones metastásicas	1, 2, 3, >3
Cirugía previa al tratamiento del cáncer	Si/no
Radioterapia	Si/no
QT adyuvante	Si/no
Número de ganglios afectados	Nº
Tratamiento anti-EGFR	
Tratamiento	Combinación utilizada
Fecha de inicio de tratamiento	Fecha
Número de ciclos	Nº
Respuesta al tratamiento	Respuesta completa (RC)
	Respuesta parcial (RP)
	Enfermedad estable (EE)
	Enfermedad progresiva (EP)
Progresión tras el tratamiento	Si/No
Fecha de progresión	Fecha

Tabla 3: Parámetros clínicos incluidos en el CRD de los pacientes. Se incluyen los parámetros demográficos y farmacológicos de interés así como la escala de cada uno de ellos. QT: Quimioterapia.

3.3 Obtención de la muestra y estudio histológico

Para el estudio de los biomarcadores se utilizaron muestras parafinadas de los tumores de los pacientes y muestras parafinadas de 10 tejidos normales de colon que fueron usadas como controles.

En colaboración con el servicio de Anatomía Patológica se realizó el estudio histológico de cada bloque de tejido para valorar la zona tumoral y el porcentaje de células tumorales presentes. Para ello, de cada bloque se hizo un corte de 6 μ M, que se tiñó con hematoxilina-eosina, y 6-10 cortes consecutivos para la purificación de ácidos nucleicos (Fig.14).



Figura 14: Bloque tumoral de un paciente: La foto de la izquierda muestra un bloque tumoral incluido en parafina así como un cristal con un corte de tejido, teñido con hematoxilina-eosina, en que se ha marcado la zona de tumor. En la foto de la derecha observamos una imagen ampliada de una tinción con hematoxilina-eosina.

3.4 Extracción de ADN

El ácido dextrirribonucleico (ADN) se purificó a partir de los cortes realizados de los bloques tumorales de cada paciente. Se macro-disecionó la zona tumoral con el fin de obtener muestra de

las células tumorales según la tinción de hematoxilina-eosina. Se aisló ADN total utilizando el kit “QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook” (Qiagen) (Fig.15).

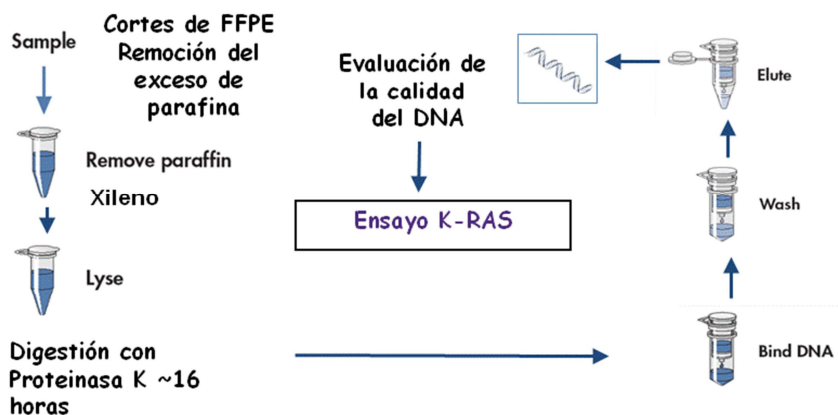


Figura 15: Esquema purificación de los ácidos nucleicos. El proceso incluye la desparafinación de la muestra, digestión con proteinasa K así como el uso de una columna de retención del ADN.

3.5 Extracción de ARN

El ácido ribonucleico (ARN) se purificó a partir de cortes de los bloques tumorales de cada paciente y de los bloques de tejido normal de colon. Se aisló ARN total siguiendo el protocolo de “Rneasy® FFPE Handbook” (Qiagen).

3.6 Cuantificación de ADN y ARN. Conservación de las muestras

Los ácidos nucleicos se valoraron en el espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 obteniéndose una medida de la concentración del ácido nucleico (ng/μL) así como de la pureza, a

través de la relación de absorbancias 260/280 (con respecto a las proteínas) y 260/230 (con respecto a las sales) (Fig.16).

Las muestras fueron almacenadas hasta su uso a -70° (ARN) y a -40 (ADN).

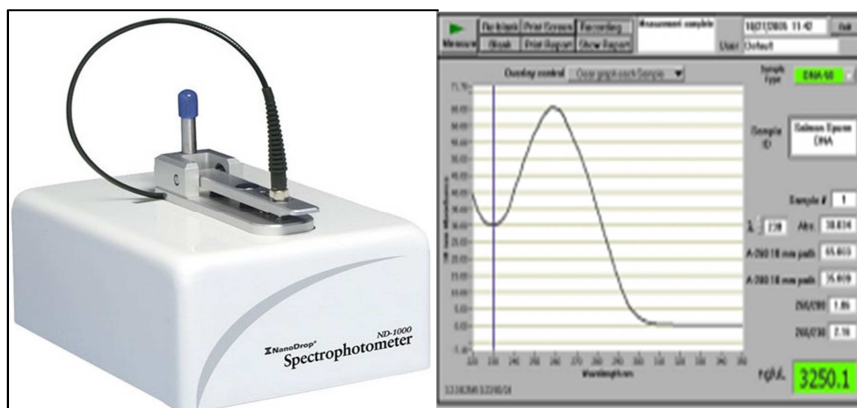


Figura 16: Espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 y software utilizado para la valoración de los ácidos nucleicos. La curva de valoración de la muestra refleja un pico de absorbancia en 260 que correspondería con el ADN presente en la muestra.

3.7 Obtención de ADN complementario a partir de ARN

Para cada muestra se pasaron 300 ng de ARN utilizando el kit comercial “The Superscript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen) para sintetizar el ADN complementario (ADNc) de cadena única. Se utilizó el método de Random Hexamers, favoreciendo así la retrotranscripción de todos los fragmentos de ARN. La reacción es catalizada por la retrotranscriptasa SuperScript II Reverse Transcriptase, con baja actividad ribonucleasa (RNasa) para obtener fragmentos de ADN

de mayor longitud. En el último paso del proceso se utiliza una RNasa H que degrada los ARNs presentes.

Los diez ADNc de tejidos normales de colon obtenidos por el proceso de retrotranscripción se mezclaron para obtener un único pool de ADNc normal, que se utilizó para la normalización de la expresión de los genes de estudio.

3.8 PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se trata de una PCR a tiempo real ya que los productos generados son cuantificados según se van generando. Para esto se utiliza un termociclador que lleva acoplado un detector laser, que mide la intensidad de fluorescencia emitida por las sondas.

En el estudio se han utilizado diferentes aparatos de qPCR: 7500 Applied Biosystems y Cobas® 4800 (ROCHE).

3.9 Estado mutacional de KRAS

El estudio de mutaciones en el exón 2, en el codón 12 y 13, del gen *KRAS* se realizó utilizándose el kit “TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit” (Qiagen) en un termociclador a tiempo real. El método combina dos tecnologías, sondas Scorpion® y ARMS® (Amplification Refractory Mutation System), siendo capaz de detectar las 7 mutaciones más frecuentes encontradas en *KRAS*,

seis en el codón 12 y una del 13, teniendo una sensibilidad analítica para dichos cambios el 1%.

3.10 Estado mutacional de *BRAF*

El estudio de la mutación V600E en el exón 15 del gen *BRAF* se hizo utilizando dos técnicas:

1. Sondas Taqman® prediseñadas, junto con los cebadores específicos. Este método fue diseñado por nosotros.

La sonda Taqman® es una sonda de 17-22 pares de bases que tiene un marcador de fluorescencia (*reporter*) unido al extremo 5', y una molécula en 3', llamada *quencher*, que inhibe la fluorescencia del anterior cuando está la molécula libre.

Las sondas empleadas en nuestro caso, además, son sondas MGB (Minor Groove Binder). Estas sondas llevan un *quencher* que se une al surco menor del ADN y se caracterizan por no ser fluorescente. Esta propiedad, permite que los equipos midan la señal del *reporter* con mayor precisión. Además, estas sondas, al ser de pequeño tamaño, determinan una mayor diferencia de la temperatura de melting, entre las sondas con la secuencia complementaria al ADN y las que difieren en un nucleótido, lo que hace que la discriminación alélica por esta técnica sea más robusta.

Durante el transcurso de la PCR la enzima ADN Polimerasa rompe la sonda gracias a su actividad exonucleasa 5'-3'. De esta manera

la molécula *reporter* ya no queda cerca del quencher y el detector del aparato detectará la fluorescencia emitida por la sonda unida. Así la fluorescencia detectada aumentará al aumentar la degradación de las sondas, que incrementa según se va generando producto (Fig.17).

En nuestro caso utilizamos esta tecnología para detectar la presencia o ausencia de una mutación puntual. Para ello, se emplean dos sondas marcadas con distintos fluorocromos, una para cada alelo (nativo/mutado) (Tabla 4). De manera que para los individuos nativos el aparato sólo registra una curva de amplificación, puesto que sólo mide la intensidad del fluorocromo cuya sonda se ha unido al ADN de presente. En individuos con presencia de mutación, heterocigotos, el aparato detecta ambos fluorocromos al unirse ambas sondas a la secuencia correspondiente.

Sonda	Marcaje 5'	Secuencia
	FAM	CTAGCTACAGaGAAATC
	VIC	CTAGCTACAGtGAAATC
Cebadores	Nombre	Secuencia
	Primer <i>sense</i>	CATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG
	Primer <i>antisense</i>	TGGGACCCACTCCATCGA

Tabla 4: Secuencia de las sondas y de los cebadores diseñados para la detección de la mutación V600E de *BRAF*. Composición del reactivo de ensayo Taqman *BRAF* V600E MGB (40x). En color azul se muestra el nucleótido involucrado la mutación V600E (A>T).

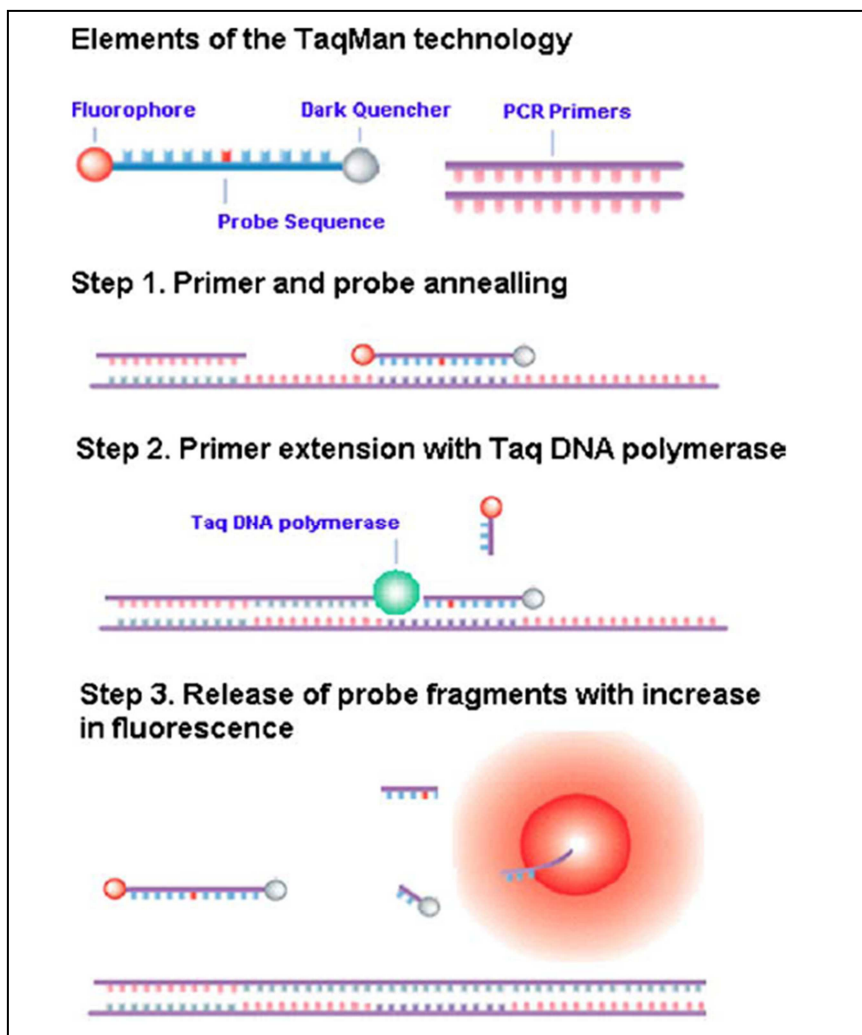


Figura. 17: Esquema de la tecnología Taqman. En la figura se muestran los elementos que utiliza la tecnología: los cebadores y las sondas marcadas con un fluorocromo. La fluorescencia de la sonda esta inhibida por el quencher y solo cuando se une al ADN y actúa la ADN polimerasa, por su actividad 5'-3' exonucleasa, se emite fluorescencia (52).

Generalmente, el nucleótido en estudio queda en el centro de la secuencia de cada sonda, lo que permite que la sonda con la secuencia complementaria se una preferentemente al ADN. Aun así, existe un cierto porcentaje de hibridaciones inespecíficas que originan señal de fondo.

Por otro lado, la mezcla de reacción lleva otro fluorocromo, que en este caso es ROX. Este fluorocromo sirve para normalizar la fluorescencia de ambas sondas. Errores en el pipeteo de la mezcla de reacción pueden acarrear errores en la medida de la fluorescencia. Esto se puede minimizar dividiendo la fluorescencia de cada sonda por la fluorescencia emitida por ROX.

El estudio se realizó en un termociclador a tiempo real 7500 de Applied Biosystems con placas de 96 pocillos utilizando los siguientes reactivos (Tabla 5).

Reactivo	Volumen por tubo
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)	10 µL
Reactivo de ensayo Taqman BRAF V600E MGB (40x)	1 µL
ADN (40ng)	1-2 µL
Agua	hasta completar
TOTAL	25 µL

Tabla 5: Condiciones de reacción para la detección del estado mutacional de *BRAF*. El reactivo de ensayo Taqman *BRAF* V600E MGB está marcado en FAM y contiene los cebadores y las sondas específicas para detectar la mutación.

- El segundo método utilizado fue un Kit comercial: kit “Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test” (ROCHE) en el aparato Cobas® 4800 (ROCHE). Dicho kit también utiliza la tecnología Taqman® (Fig.18).

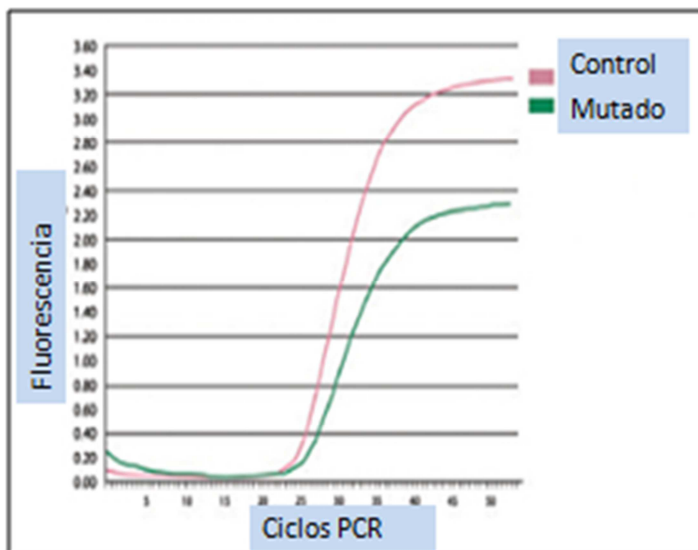


Figura 18: Representación gráfica de una muestra mutada en *BRAF*. Cada uno de los colores corresponde a un marcaje fluorescente diferente.

3.11 Estado mutacional de *PIK3CA*

Se determinó con el kit “*PIK3CA Mutation Test Kit*” (Qiagen) utilizando el termociclador a tiempo real 7500 de Applied Biosystems. Dicho kit utiliza dos tecnologías, ARMS® y Scorpion®, al igual que el kit de Qiagen, para la detección del estado mutacional de *KRAS*, detectando cuatro mutaciones en los exones 9 y 20 de dicho gen: E542K, E545D, E545K/D (exón 9) y H1047R (exón 20).

3.12 Amplificación del gen de β -actina para la confirmación de la retrotranscripción

Se amplifica el gen de la β -actina (gen endógeno) mediante PCR con AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Las condiciones de la

mezcla de reacción así como las de la PCR se detallan las Tablas 6 y 7. La PCR se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Reactivo	Volumen/cantidad por tubo
Buffer 10x	2.5 µL
dNTPs 2.5 mM	1 mM
Cl2Mg 50x	1.25 µL
Cebadores específicos	10 pmoles
ADNc	2-4 µL
Ampli Taq Gold®	0.2 µL
Agua DEPC	hasta 25 µL
TOTAL	25 µL

Tabla 6: Condiciones de la mezcla de reacción de PCR para la detección de β -actina.

Fase	Temperatura (T°)	Tiempo(t)	
Activación enzimática	94°C	10 min	
Desnaturalización	94°C	1 min	
Hibridación	57°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	*45
Elongación	72°C	10 min	

Tabla 7: Condiciones de la PCR. La tabla detalla las fases de la PCR, así como la temperatura y el tiempo utilizadas de cada una de ellas. *45 número de ciclos de la PCR

3. 13 Valoración de la expresión de AREG y EREG mediante QPCR

Para los ensayos de expresión de AREG y EREG se utilizaron ensayos *Taqman on demand*. Estos ensayos están diseñados y comercializados por Applied Biosystems. El reactivo de ensayo de expresión de cada gen diana, incluye la sonda y los primers

necesarios para la PCR. En la Tabla 8 indicamos los ensayos utilizados en nuestro estudio.

Genes	Nombre	Referencia reactivo de ensayo de expresión
Genes diana	EREG	Hs00154995_m1
	AREG	Hs00155832_m1
Gen de referencia	PSMB4	Hs00160598

Tabla 8: Ensayos Taqman de los genes diana y de referencia utilizados. La tabla muestra los genes utilizados así como el ID de los ensayos de expresión.

La región que se detecta en estos estudios corresponde a una secuencia comprendida entre dos exones, por lo que se asegura que la fluorescencia emitida es responsable de la unión de la sonda al ADNc y no al genómico, que llevaría incluido intrones y no se uniría. Así conseguimos que la fluorescencia medida corresponda solo a expresión (Fig.19).

Todas las sondas fueron del tipo MGB y estaban marcadas con FAM por lo que los ensayos fueron realizados en pocillos diferentes.

El ensayo trata de una cuantificación relativa. Está basado en la determinación del Ct, que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia emitida sobrepasa el umbral del ruido. En nuestra qPCR el ADN lo vamos a cuantificar de manera relativa, ya que no es posible conocer la cantidad de ADNc de partida.



Figura 19: Ensayo de expresión Hs00154995 de Life technologies para EREG, localización del gen en el cromosoma y principio de la secuencia del ADNc. El marcaje en gris corresponde a la sonda marcada que utiliza el ensayo y que corresponde con la unión entre los dos exones. El exón 1, marcado en negro y el exón 2, marcado en azul.

En la cuantificación relativa se refiere la cantidad del ADNc del gen diana respecto de la de un gen endógeno. Dicho endógeno debe de tener la peculiaridad de mantener constante su concentración celular bajo cualquier circunstancia. Evidentemente, no existe ningún gen con tal comportamiento. De todos modos, tradicionalmente y de forma aproximada, se emplean como endógenos genes que se expresan en alta proporción y en todas las células, como son los genes *housekeeping* (53). Estos son genes

constitutivos necesarios para el mantenimiento de las funciones celulares básicas que se expresan en células normales así como en condiciones patológicas.

En nuestro estudio se utilizó como gen endógeno el PSMB4 (proteasome, prosome macropain, subunit, beta type, 4). Este gen produce la subunidad β tipo 4 del proteasoma. El proteasoma es un complejo proteico multicatalítico con una estructura central (core) en forma de anillo llamada 20S, en el cual se encuentra PSMB4, y dos regiones adyacentes reguladoras. En la Fig.20 se muestra el Ct intra-serie de PSMB4 en diferentes muestras, que muestra la homogeneidad en la expresión de dicho gen (54).

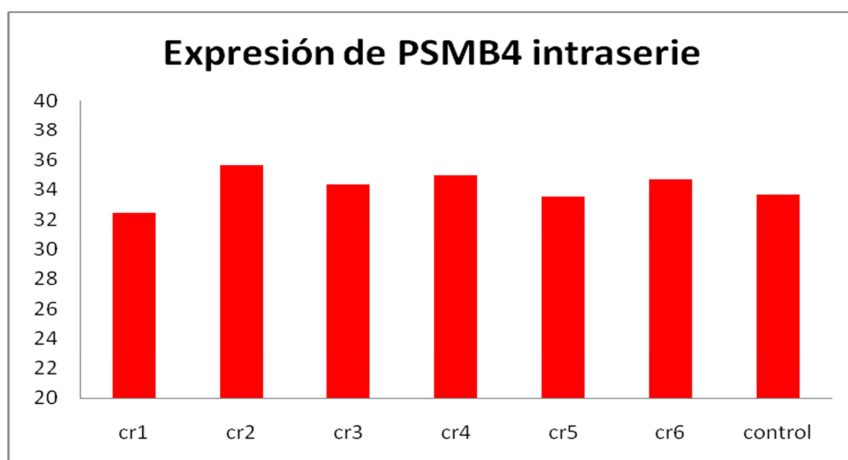


Figura 20: Expresión de PSMB4 en las muestras de una placa de ensayo. Los datos de expresión (eje de ordenadas) están en Ct y el valor representa la media de los duplicados o triplicados de la muestra. En el eje de abscisas representamos el nombre de la muestra.

En este tipo de ensayos se asume que todos los factores que puedan modificar la concentración del ARN o ADNc durante el procesamiento de las muestras afectan por igual ambos genes. Así,

por ejemplo, se presupone una misma eficacia de la retrotranscripción de los dos ARNs mensajeros.

Las condiciones de la reacción PCR y las condiciones de temperaturas y ciclos se muestran en las tablas 9 y 10.

Se realizó el experimento en el termociclador a tiempo real 7500 de Applied Biosystems en placas de pocillos.

Reactivo	Volumen
Fast Start TaqMan universal PCR Master Mix 2x no Amperase	8 μ L
Reactivo del ensayo de expresión (20x)	1 μ L
ADNc	1 μ L
Agua	hasta 20
TOTAL	20 μ L

Tabla 9: Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR en el ensayo de expresión.

Fase	T ^a	t ^o	
Activación enzimática	50°C	2min.	
Desnaturalización	95°C	10 min.	
Desnaturalización	57°C	15 s	
Hibridación/extensión	60°C	1 min.	*45

Tabla 10: Condiciones de la PCR. Condiciones de temperatura y de tiempo. Cada muestra se hizo por triplicado incluido el pool control.

Cálculos de los niveles de expresión de PSMB4, AREG y EREG

Todas las muestras se analizaron por triplicado y se dieron por válidas si al menos dos de los Ct's de los triplicados no difirieren en más de 1 unidad.

Como ADNc controles se utilizó el pool de 10 ADNc de tejido normal de colon.

Los cálculos se realizaron por el método de comparación del Ct. Calculamos la cantidad de los genes diana (*AREG* y *EREG*) normalizando el resultado del Ct de cada gen diana con el Ct del endógeno (*PSMB4*) y del Ct de un pool control incluido en la misma placa que las muestras.

Cantidad del gen diana: $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Es decir la expresión relativa para cada gen viene dada por los resultados de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ muestra a estudio} - \Delta C_t \text{ pool control.}$$

$$\Delta C_t = C_t \text{ gen diana} - C_t \text{ gen endógeno.}$$

3.14 Análisis estadístico

Las variables discretas se describieron con la distribución de frecuencias mientras que las variables continuas se describieron empleando la media \pm la desviación estándar (DE), en el caso de distribuciones normales, y la mediana y los rangos intercuartílicos (RI), en el caso de distribuciones no normales.

Las variables continuas *AREG* y *EREG* se categorizaron por tertiles y, al igual que las discretas, se describieron con la distribución de las frecuencias.

Las variables independientes principales son el estado mutacional de *BRAF*, el de *PIK3CA*, la expresión de AREG y la de EREG y finalmente la respuesta.

Las variables dependientes del estudio son la SLP y la SG.

La SG fue definida como el tiempo entre la fecha de inicio de tratamiento anti-EGFR y la fecha de la última observación, ya sea por éxito, pérdida de seguimiento o fecha de cierre del estudio.

La SLP fue definida como el tiempo entre la fecha de inicio de tratamiento anti-EGFR hasta la progresión de la enfermedad.

Se evaluó la asociación de las variables moleculares independientes, *BRAF*, *PIK3CA*, AREG y EREG (categorizadas) con la respuesta mediante los test estadísticos Chi-cuadrado de Pearson o bien el exacto de Fisher. Este último se utiliza en el caso de que al menos en una de las casillas haya una frecuencia inferior a 5. En ambos casos se realizó un análisis de cálculo de riesgo relativo (RR) entre los grupos, presentándose el RR junto a sus intervalos de confianza (IC) al 95% y nivel de significación.

Las curvas de supervivencia fueron estimadas por la técnica de Kaplan-Meier para la SG y la SLP. La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizará mediante el test de long-Rank o también llamado Mantel-Cox test. Tras esto se realizó análisis multivariante por Regresión COX

presentándose las “razones de tasas” (Hazard-Ratio (HR)) junto a sus intervalos de confianza (IC) al 95% y su nivel de significación.

Utilizamos el coeficiente de correlación de Spearman para correlacionar las variables AREG y EREG, continuas y no normales.

En todos los contrastes de hipótesis se rechaza la hipótesis nula con un error de tipo I menor de 0.05 ($p < 0.05$) considerándose en caso contrario no significativo (NS) el análisis.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando los programas SPSS 12.0.

4. RESULTADOS

4.1 Descripción del grupo de pacientes

Un total de 107 pacientes, procedentes de 10 centros diferentes, fueron incluidos en el estudio (Tabla 11).

Hospital	Localidad	Nº Pacientes
Hospital Clínico San Carlos	Madrid	27
Hospital General Universitario Gregorio Marañón	Madrid	18
Hospital Universitario de la Princesa	Madrid	12
Hospital Universitario Ramón y Cajal	Madrid	11
Hospital Universitario de Getafe	Madrid	9
Hospital Universitario Reina Sofía	Córdoba	8
Hospital Fundación Jiménez Díaz	Madrid	8
Hospital Universitario 12 de Octubre	Madrid	6
Hospital Universitario Fundación Alcorcón	Madrid	5
Hospital Universitario La Paz	Madrid	3
TOTAL		107

Tabla 11: Hospitales incluidos en el estudio multicéntrico. La tabla muestra el número de pacientes aportados por cada uno de ellos así como el total de los pacientes incluidos en el estudio.

4.2 Seguimiento de los pacientes

4.2.1 Demográfico y características tumorales

Se recogieron los datos clínicos mencionados de cada uno de los pacientes para rellenar los CRD. Algunos datos no se pudieron conseguir. Más adelante, en cada caso detallamos las razones de las pérdidas.

De los 107 casos recogidos, 70 fueron varones (65,4%) y 37 mujeres (34,6%). La mediana de edad resultó ser de 68,24 años, con una edad mínima de 29 años y máxima de 85 años (Tabla 12).

Número de pacientes	n=107
Mediana de edad e IC (años)	68,24 (29-85)
Sexo	(%)
Varones	65,4
Mujeres	34,6

Tabla 12: Características demográficas del grupo de pacientes de estudio.
NV: no valorable. IC: intervalo de confianza al 95%.

En la Tabla 13 se presentan las características tumorales de estos pacientes. En ella vemos que la mayor parte de los pacientes tenían localización tumoral en el colon (66,4%), con metástasis en 1 ó 2 órganos (40,2% y 30,8% respectivamente). La mayoría, (69,2%) habían sido sometidos a cirugía previa a la administración de la terapia. Por otra parte, la mayoría de los pacientes no habían recibido QT ni radioterapia.

4.2.2 Supervivencia de los pacientes

La mediana de seguimiento fue de 15,80 meses con un mínimo de 0 meses hasta un máximo de 62,25 meses.

La SLP pudo ser estudiada en 99 pacientes obteniéndose una mediana de 8,4 meses (IC del 95%, 7,5-10,4) con unos intervalos mínimo y máximo de 0,46 y 33,75 meses respectivamente (Fig.21). Con un seguimiento medio del estudio de 15,8 meses, solo 8 pacientes no progresaron.

Localización del tumor primario (%)	
Colon	66,4
Recto	13,1
Colon y recto	2,8
NV	17,7
Número de localizaciones metastásicas (%)	
1	40,2
2	30,8
3	11,2
>3	13,1
NV	4,7
Cirugía previa al tratamiento del cáncer (%)	
No	17,8
Si	69,1
NV	13,1
Radioterapia (%)	
No	68,2
Si	18,7
NV	13,1
QT adyuvante (%)	
No	57,9
Si	29,0
NV	13,1
Número de ganglios afectados (%)	
0	14,0
De 1 a 3	13,1
≥ 4	12,2
NV	60,7

Tabla 13: Características tumorales del grupo de pacientes de estudio. NV: no valorable. QT: quimioterapia.

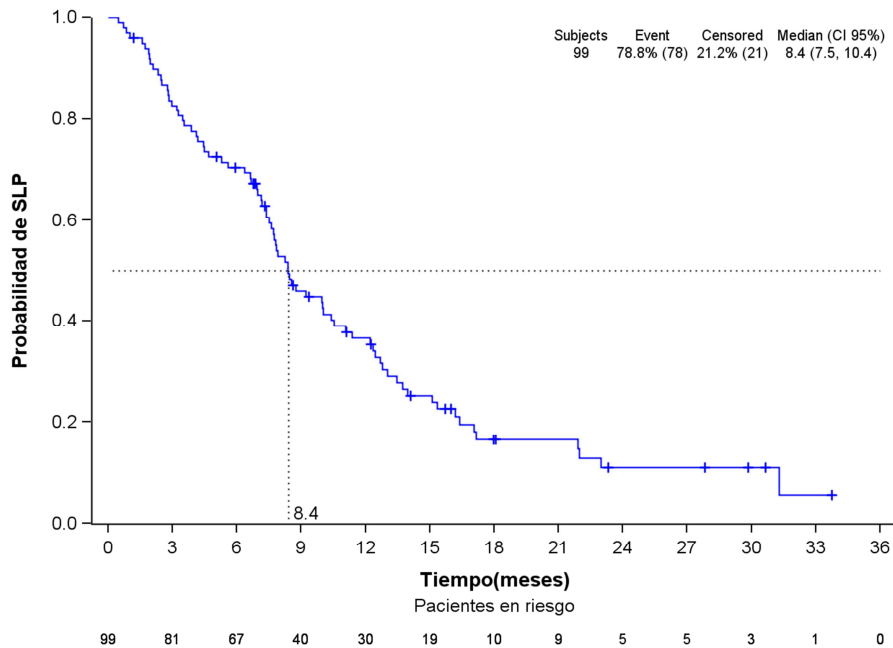


Figura 21: Curva de Kaplan-Meier de SLP. En el eje de las x se muestra la estimación de la mediana de la curva así como el número de pacientes con los que se cuenta a lo largo del tiempo. SLP= supervivencia libre de progresión.

La SG pudo ser estudiada en los 107 pacientes, obteniéndose una mediana de 20,3 meses (IC al 95%, 15,5-25,9) con un intervalo mínimo y máximo de 0 y de 62,3 meses respectivamente (Fig.22). Con un seguimiento de 15,8 meses, el porcentaje de éxitos fue de 64,48% (69/107).

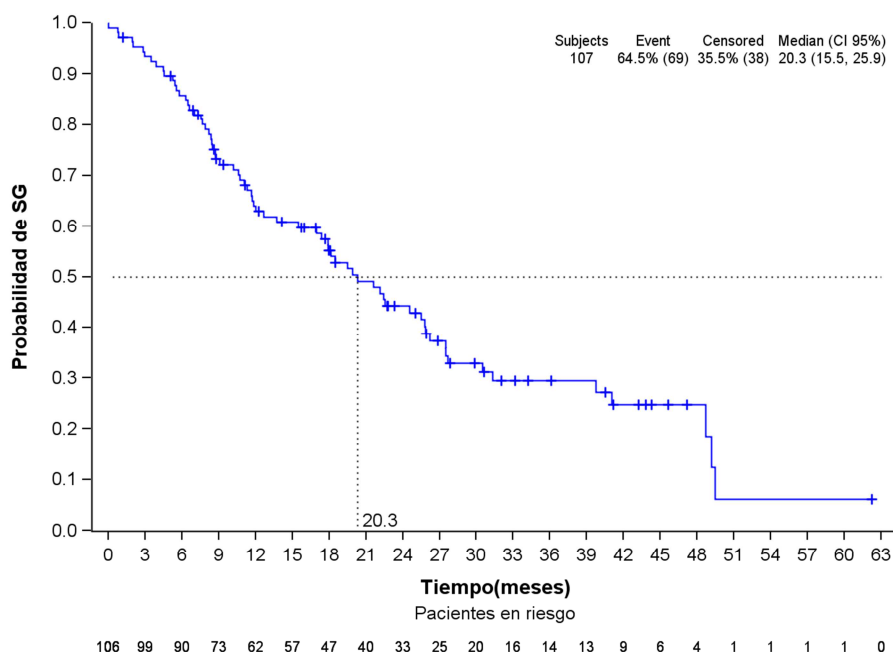


Figura 22: Curva de Kaplan-Meier de SG. En el eje de las x se muestra la estimación de la mediana de la curva así como el número de pacientes con los que se cuenta a lo largo del tiempo. SG= supervivencia global.

4.2.3 Tratamiento anti-EGFR

En cuanto al tratamiento anti-EGFR, el más utilizado fue la combinación de cetuximab con FOLFOX, con un 44,8% del total de los tratamientos utilizados (Fig.23). El oxaliplatino fue la QT más utilizada en combinación con el tratamiento anti-EGFR, representando el 61,6 %. Por otra parte, el panitumumab fue escasamente utilizado en nuestros pacientes, habiéndose utilizado en la terapia de un 4,7% del total de los pacientes.

Dichas terapias se administraron desde finales del año 2005 hasta finales de 2011 con un grupo mayoritario en los años 2009 y 2010.

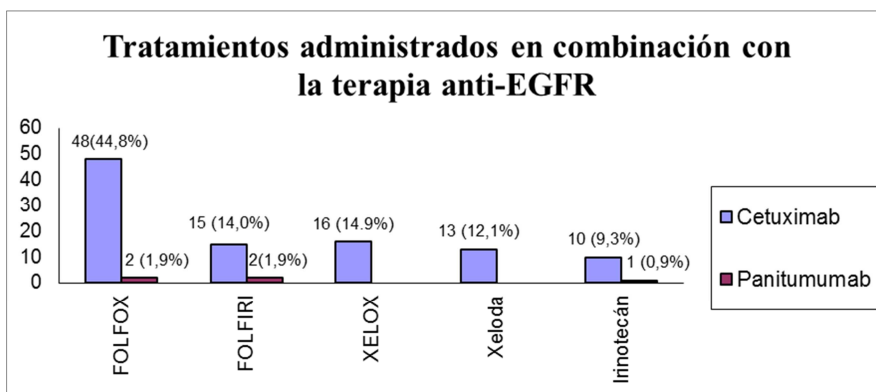


Figura 23: Pautas de tratamiento utilizadas. Se muestra el número absoluto y el porcentaje dentro de cada combinación.

4.2.4. Respuesta al tratamiento anti-EGFR

Se disponen de datos de respuesta en 97/107 pacientes. En 10 pacientes no pudo evaluarse la respuesta.

Fijándonos en la respuesta a la terapia administrada, 48/97 (49,5%) pacientes presentaron respuesta total al fármaco, siendo 4 (4,1%) aquellos con respuesta completa (RC) y 44 (45,4%) con respuesta parcial (RP). Por otro lado, 49/97 (50,5 %) no respondieron, progresando 24 (24,7%) (EP) y estabilizándose 25 (25,8 %) (EE) (Fig.24).

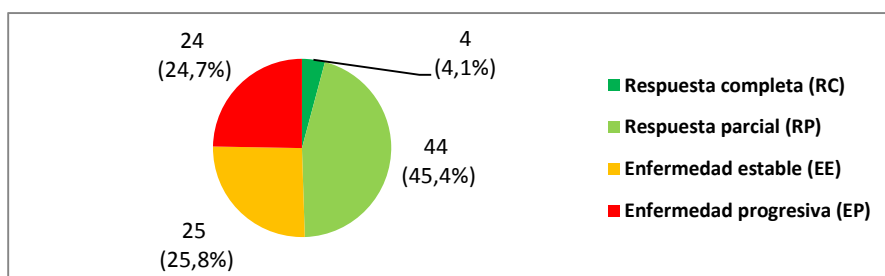


Figura 24: Respuesta al tratamiento anti-EGFR. Representación gráfica en porcentajes de la respuesta de los pacientes al tratamiento. RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; EP: enfermedad progresiva.

4.2.5 Estudio de supervivencia global en relación con la respuesta

Con una n de 97 pacientes, el análisis de supervivencia en relación a la respuesta muestra una diferencia significativa ($p < 0,0004^{***}$) entre el grupo de pacientes no respondedores (EE+EP), con una mediana de 10,6 meses, frente al grupo de pacientes respondedores (RC+RP), con una mediana de 27,7 meses (Fig.25). A su vez, el estudio de comparación de los no respondedores frente a los respondedores utilizando el modelo de regresión COX presentó una HR de 2,4295 (IC 95% 1,4679-4,0212 con una $p = 0,0006^{***}$).

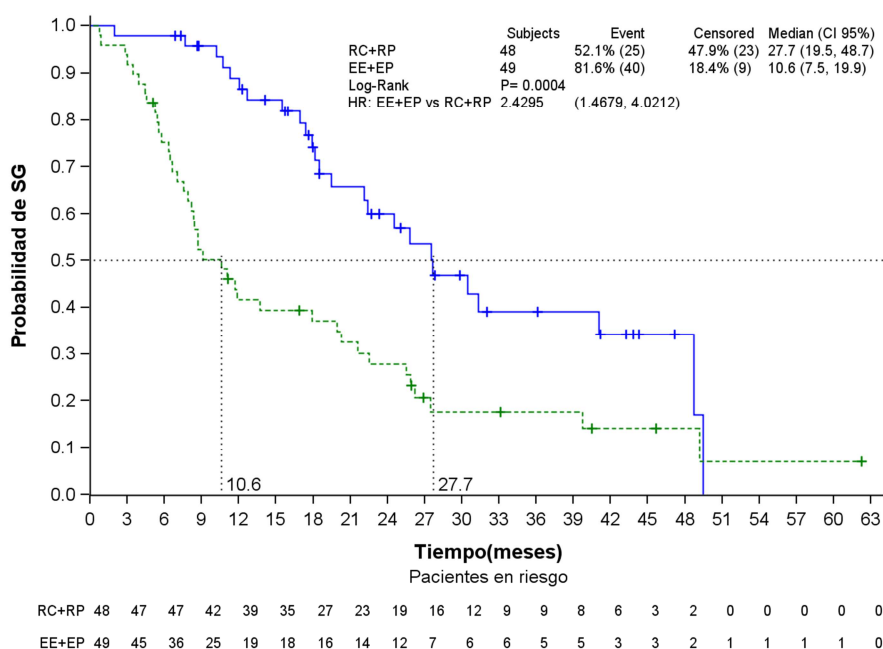


Figura 25: Curvas de Kaplan-Meier de SG con la respuesta. Los pacientes respondedores (RC+RP) presentan una curva de supervivencia (azul) mejor que la de los no respondedores (EE + EP) (verde). En el eje de las x se muestra la estimación de las medianas de ambas curvas.

4.3 Estudio de biomarcadores

Mediante el estudio de mutaciones de *KRAS*, se seleccionaron 107 pacientes con *KRAS* nativo que fueron incluidos para nuestro estudio con criterios de intención de tratar.

4.3.1 Estudio de la mutación V600E en el gen *BRAF*

BRAF pudo ser determinado en 104 pacientes no pudiéndose determinar en tres pacientes debido a insuficiencia de la muestra. Los resultados fueron, iguales por las dos técnicas para todos los pacientes obteniéndose un 100% de correlación.

En el estudio, 8/104 pacientes (7,69 %) presentaron la mutación V600E en *BRAF* mientras que 96/104 pacientes (92,31%) fueron *BRAF* nativos (Fig.26).

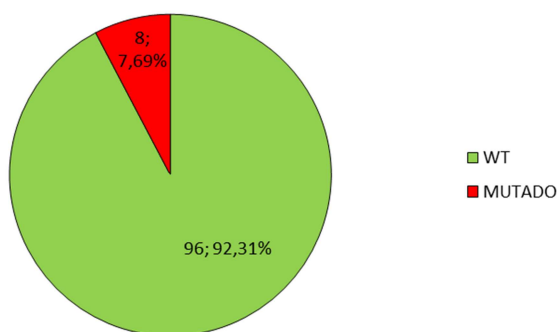


Figura 26: Estado mutacional de *BRAF* en la población de estudio. Todos los pacientes además presentaban *KRAS* nativo.

4.3.1.1 Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según el estado de *BRAF*

Se pudieron evaluar 94 respuestas de los 104 pacientes con determinación de *BRAF*. La distribución de las frecuencias se presentan en la Tabla 3, agrupando en respondedores (RC+RP) y no respondedores (EE+EP), y destacamos que 7 de 8 pacientes con *BRAF* mutado no respondieron al tratamiento (87,5%) frente a 41 de 86 con *BRAF* nativo (47%). El análisis entre el estado de *BRAF* y la respuesta rozó la significación ($p=0,059$) con un RR de 1,835 con IC al 95% entre 1,302-2,586 de los pacientes con *BRAF* mutado frente a los nativos (Tabla 14).

		RESPUESTA				Estimación del riesgo		
		RC+RP	EE+EP			p	RR	95,0% IC (Inferior y superior)
<i>BRAF</i>	Nativo	45 (52,3%)	41 (47,7%)	86 (100%)	0,059	1		
	Mutado	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)		1,835	1,302	2,586
Total		46 (48,9%)	48 (51,1%)	94 (100%)				

Tabla 14: Tabla de contingencia entre *BRAF* y la respuesta. Análisis estadístico y estimación de riesgos. La respuesta está dividida en respondedores (RC+RP) y no respondedores (EE+EP).

4.3.1.2 Estudio de SLP en relación al estado de *BRAF*

Este estudio se hizo en 96 pacientes. La estimación de las medianas de SLP del grupo de pacientes con *BRAF* nativo fue de 8,8 meses frente a 7,3 meses del grupo con *BRAF* mutado. Se han detectado diferencias

estadísticamente significativas entre dichas funciones de supervivencia ($p=0,0084^{**}$) (Fig.27).

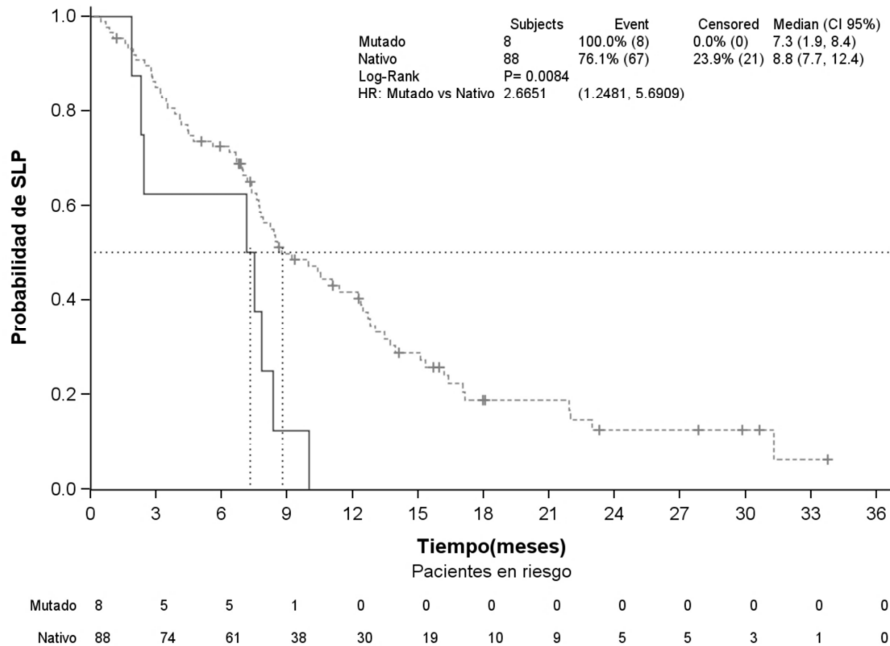


Figura 27: Curvas de Kaplan-Meier en SLP según el estado mutacional de *BRAF*. Los pacientes con estado de *BRAF* nativo mostraron mejor curva de SLP (discontinua) que aquellos con estado mutado (continua).

4.3.1.3 Estudio de SG en relación al estado de *BRAF*

Con una n de 104 pacientes, la estimación de medianas de SG en el grupo de pacientes con *BRAF* nativo fue de 22,4 meses frente a 8 meses del grupo de pacientes con *BRAF* mutado presentando unas curvas de supervivencia significativamente diferentes ($p=0,0073^{**}$) (Fig.28). El análisis de regresión COX mostró una HR de 2,842 (IC 95% 1,279-6,312 con una $p=0,0103^{*}$) del grupo mutado frente al nativo.

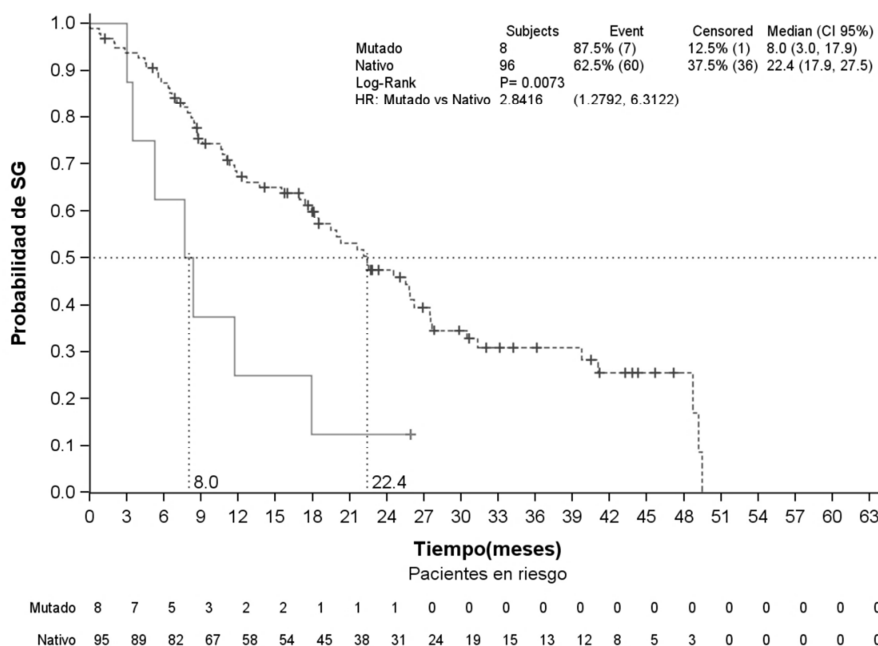


Figura 28: Curvas de Kaplan-Meier en SG según el estado mutacional de *BRAF*. Los pacientes con estado de *BRAF* nativo mostraron mejor curva de SG (discontinua) que aquellos con estado mutado (continua). En el eje de las x se muestra la estimación de las medianas de las curvas.

4.3.2 Estudio de mutaciones en los exones 9 y 20 del gen *PIK3CA*

El estudio de las mutaciones E542K, E545K/D (exón 9) y H1047R (exón 20) en el gen *PIK3CA*, se realizó en 100 pacientes y mostró que 10/100 (10%) pacientes tenían *PIK3CA* mutado, frente a 90/100 (90%) que lo presentaban nativo. La mutación E542K fue la más frecuente y se encontró en 5 pacientes, la H1047R en 3 pacientes y la E545K/D en 2 pacientes (Fig.29).

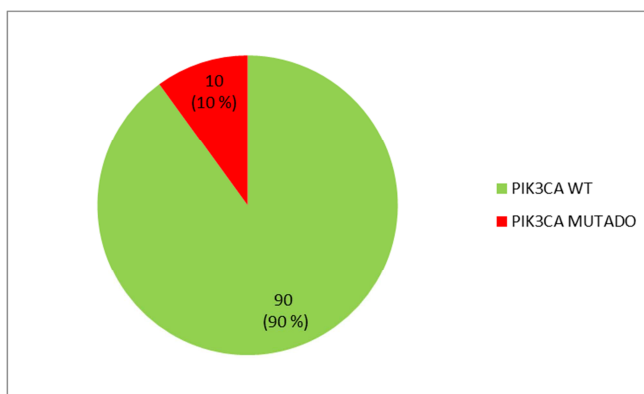


Figura 29: Estado mutacional de *PIK3CA* en la población de estudio. Todos los pacientes además habían presentado *KRAS* nativo.

4.3.2.1 Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según el estado de *PIK3CA*

Se pudieron evaluar 91 respuestas de los 100 pacientes con determinación de *PIK3CA*. La distribución de las respuestas fue prácticamente igual entre los pacientes con *PIK3CA* nativos y *PIK3CA* mutados. 41/82 (50%) de los *PIK3CA* nativos no respondieron al tratamiento frente a 4/9 (44,44%) con *PIK3CA* mutado (Tabla 15). El análisis entre el estudio de *PIK3CA* y la respuesta no mostró diferencia significativa ($p=1$). El RR en el grupo mutado respecto al grupo nativo es de 1,250 con IC al 95% entre 0,3132-4,9896.

		RESPUESTA		Total	Estadístico
		RC+RP	EE+EP		p
<i>PIK3CA</i>	Nativo	41(50%)	41 (50%)	82 (100%)	1
	Mutado	5 (55,56%)	4 (44,44%)	9 (100%)	
Total		45 (50%)	45 (50%)	91(100%)	

Tabla 15: Tabla de contingencia entre *PIK3CA* y la respuesta. Análisis estadístico. La respuesta está dividida en respondedores (RC+RP) y no respondedores (EE+EP).

4.3.2.2 Estudio de SLP en relación al estado de *PIK3CA*

Con una n de 92 pacientes, el análisis de SLP también resultó no significativo ($p=0,6271$). Se obtuvieron medianas de SLP del grupo nativo de 8,5 meses frente a 8,6 meses del grupo mutado (Fig.30). El análisis de regresión COX presentó una HR de 0,823 (IC 95% 0,374-1,811, $p=0,6278$, NS) del grupo mutado frente al nativo.

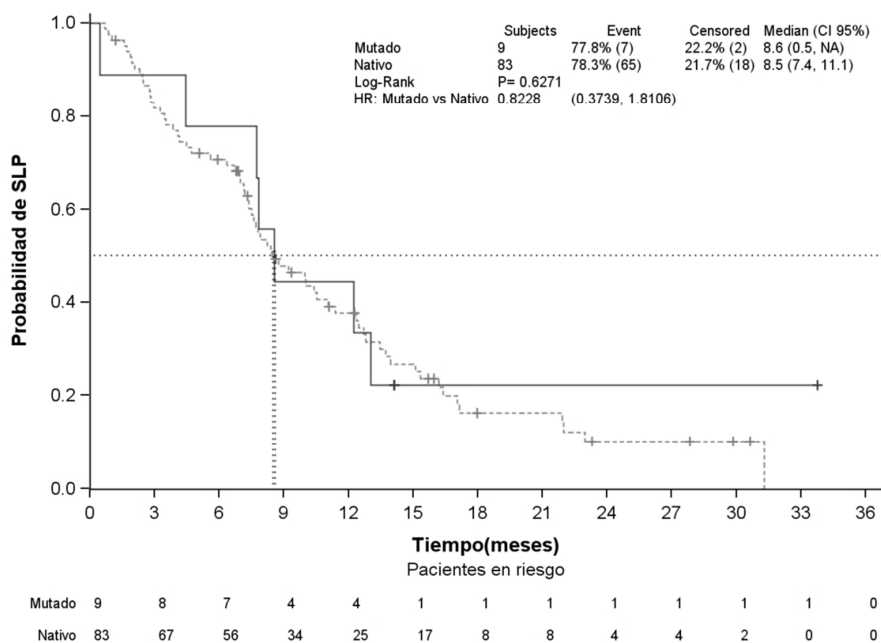


Figura 30: Curvas de Kaplan-Meier de SLP según el estado mutacional de *PIK3CA*. Se presentan las curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes con estado de nativo (discontinua) frente a aquellos con estado mutado (continua).

4.3.2.3 Estudio de SG en relación al estado de *PIK3CA*

Con una n de 100 pacientes se obtuvieron medianas de SG entre el grupo nativo de 19,5 meses frente a 27,5 meses del grupo mutado. El

análisis de regresión COX mostró una HR de 0,702 (IC 95% 0,301-1,634, $p=0,409$, NS) del grupo mutado frente al nativo(Fig.31).

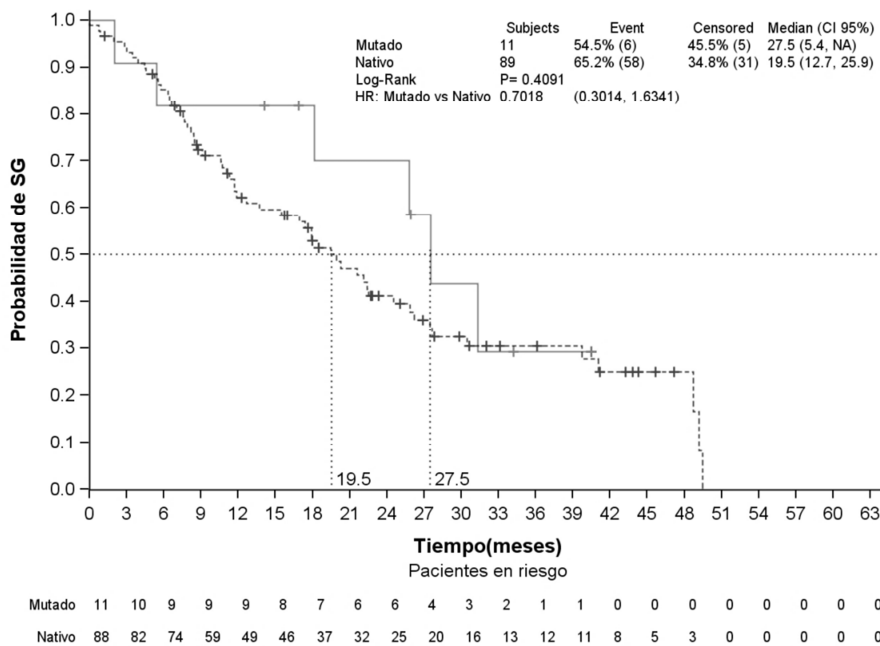


Figura 31: Curvas de Kaplan-Meier de SG según el estado mutacional de *PIK3CA*. Se presentan las curvas de supervivencia global (SG) de los pacientes con estado de nativo (discontinua) frente a aquellos con estado mutado (continua) junto a la estimación de las medianas de dichas curvas.

4.3.3 Expresión relativa de AREG y EREG

Cálculo de la expresión relativa de *AREG* y *EREG*: los estudios de expresión de los ligandos AREG y EREG así como del gen endógeno *PMSB4*, se llevaron a cabo por triplicado en el ADNc de los tumores de los pacientes. En todas las placas de 96 pocillos se incluyó un triplicado del pool control de tejido de colon normal para cada uno de los genes. La figura 32 muestra un ejemplo de las gráficas de expresión obtenidas por PCR a tiempo real (qPCR).

La expresión del gen endógeno (*PSMB4*) inter serie mostró un promedio de Ct de $32,72 \pm 0,64$ con un 1,94 % de coeficiente de variación (Fig.33).

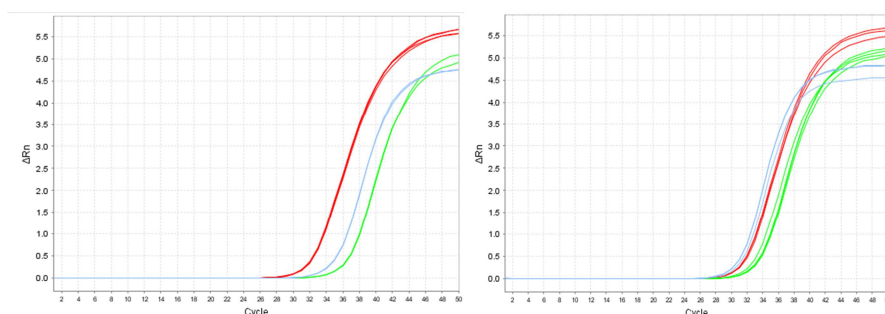


Figura 32: Curvas de expresión de los genes de estudio por qPCR. La figura de la izquierda corresponde al pool control y la de la derecha a una muestra tumoral. A su vez cada color corresponde a un ensayo de expresión diferente: *AREG* (azul), *EREG* (verde) y *PSMB4* (rojo). Las curvas para cada ensayo están triplicadas.

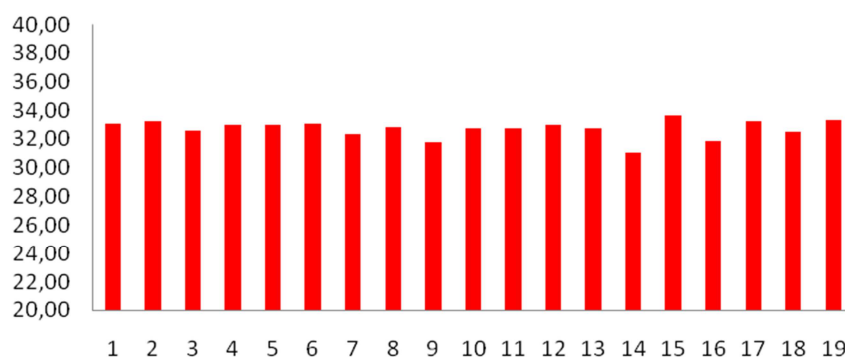


Figura 33: Expresión de *PSMB4* en el pool control. Los datos de expresión (eje de ordenadas) están en Ct y representan la media de los duplicados o triplicados de la muestra mientras que en el eje de abscisas representamos el n° de la serie o placa.

4.3.4 AREG

La expresión de *AREG* en el pool control inter serie mostró un promedio de Ct de $34,13 \pm 2,01$ con un 5,89% de coeficiente de variación (Fig.34).

El estudio de expresión se llevó a cabo en 83 pacientes. El resto no pudo ser evaluado por no poder obtener ARN de las muestras.

La expresión relativa de *AREG* en los pacientes presentó una distribución no normal situándose la mediana de expresión en 3,88 con unos IC entre 2,15-9,32 (Fig.35).

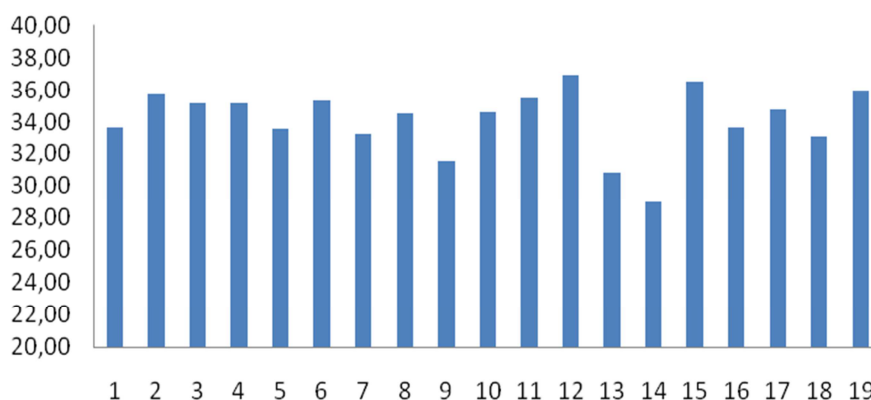


Figura 34: Expresión de *AREG* en el pool control. Los datos de expresión (eje de ordenadas) están en Ct y presentan la media de los duplicados o triplicados de la muestra mientras que en el eje de abscisas representamos el nº de serie o placa.

La variable se categorizó por tertiles presentando en la Tabla 16 los grupos resultantes.

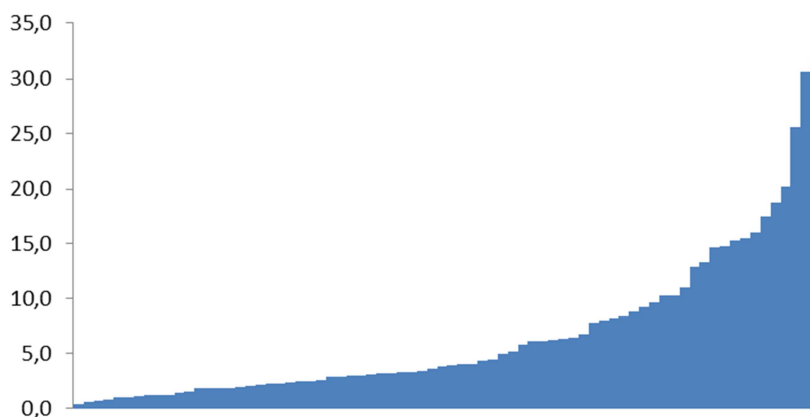


Figura 35: Expresión relativa de AREG en los pacientes de estudio. En el eje de abscisas se representan los pacientes y en el de ordenadas la expresión.

	Grupo	Por tertiles	Nº Absoluto	Porcentaje (%)
AREG	1	<2,9	28	33,70
	2	3-6,7	28	33,70
	3	>6,8	27	32,50
	Global		83	100%

Tabla 16: Grupos de expresión de AREG por tertiles.

4.3.4.1 Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según la expresión de AREG

Se pudieron evaluar 74 respuestas de los 83 pacientes con expresión de AREG. La mayoría de los pacientes con expresión baja de AREG (69%) no respondieron al tratamiento frente al 33,3% de los que presentaron alta expresión. El análisis entre la expresión de AREG y la respuesta mostró una diferencia significativa ($p=0,0027^{**}$) presentando los pacientes con expresión de AREG baja (≤ 3) un RR aumentado de no responder de 2,069 con IC al 95% entre 1,280-3,343 (Tabla 17).

		RESPUESTA		Total	Estadístico	Estimación del riesgo		
		RC+RP	EE+EP		p	RR	95,0% IC (Inferior y superior)	
Expresión AREG	≤ 3	9 (31%)	20 (69%)	29 (100%)	0,0027**	2,069	1,280	3,343
	>3	30 (66,7%)	15 (33,3%)	45 (100%)		1		
Total		39 (52,7%)	35 (47,3%)	74 (100%)				

Tabla 17: Tabla de contingencia entre AREG y la respuesta. Análisis estadístico y estimación de riesgos. La respuesta está dividida en respondedores (RR) y no respondedores (no RR).

4.3.4.2 Estudio de SLP en relación a la expresión de AREG

Con una n de 74 pacientes, el análisis de SLP por tertiles resultó significativo. La estimación de las medianas fue: 7,17 meses para el grupo 1, 10 meses para el grupo 2 y 10,4 meses para el grupo 3.

Podemos apreciar en la figura 36 que los grupos 2 y 3 presentan curvas de supervivencia muy similares. Debido a esto y no conociendo el punto de corte de expresión, se decidió unificar dichos grupos para hacer un nuevo análisis estadístico.

Así conseguimos un nivel de significación de $p=0,0158^*$, obteniendo medianas de SLP en el grupo con expresión de AREG > 3 , de 10,5 meses frente a 7 meses del grupo con AREG < 3 . El análisis de regresión COX mostró una HR de 0,5307 (IC 95% 0,3149- 0,8943 con una $p=0,0173^*$) del grupo con mayor expresión frente al de menos (Fig.37).

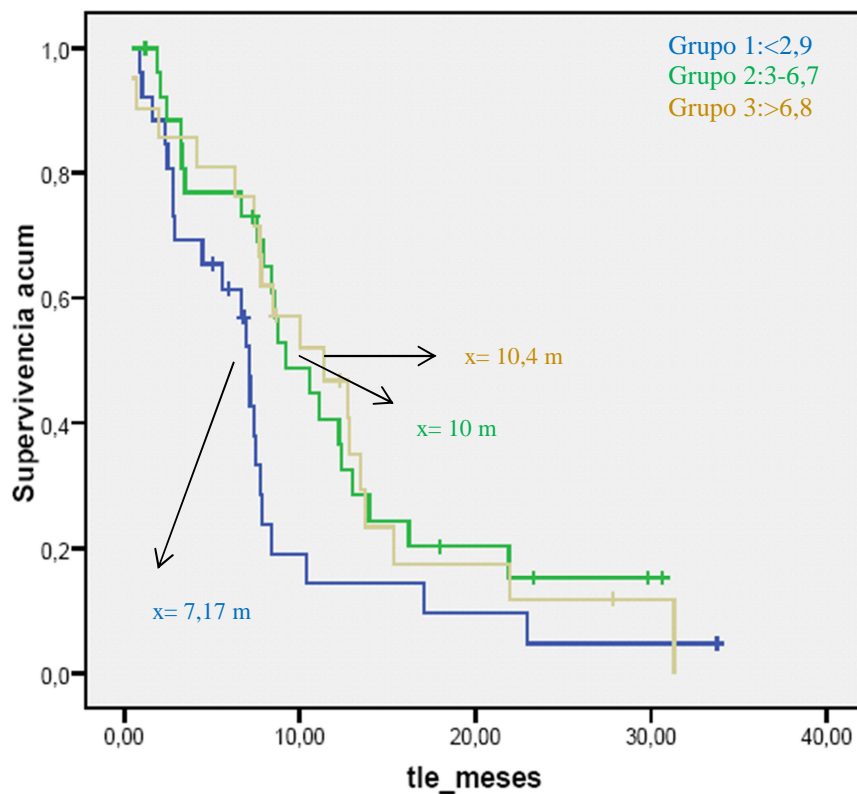


Figura 36: Curvas de Kaplan-Meier en SLP según la expresión de AREG por tertiles. Las curvas de SG de los grupos 2 (verde) y 3 (amarilla) se diferencian visiblemente con respecto a la del grupo 1 (azul). Tle_meses: supervivencia libre de progresión (SLP).

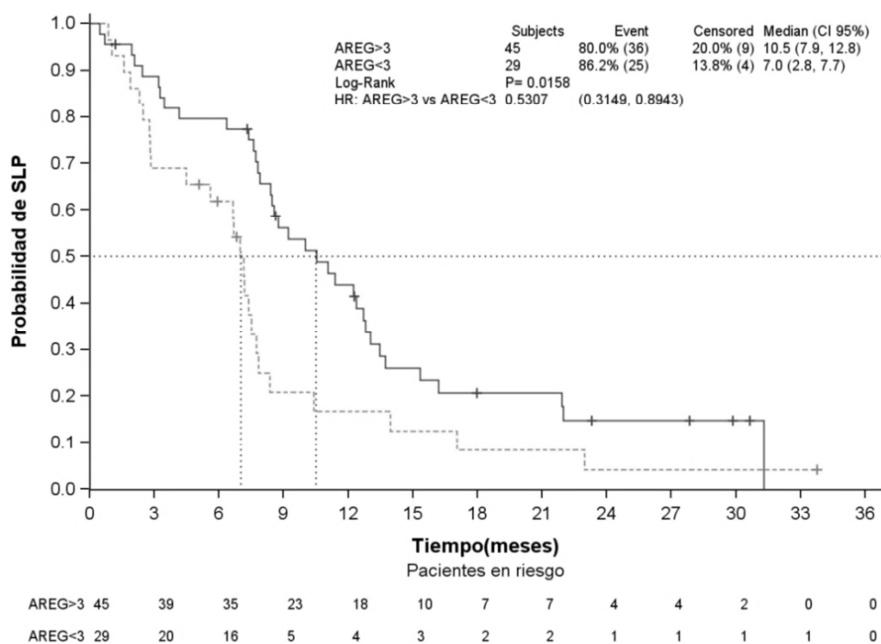


Figura 37: Curvas de Kaplan-Meier en SLP según la expresión de AREG (<3/>3). Las curvas de SG del grupo de expresión >3 (continua) se diferencia visualmente del grupo de expresión < 3 (discontinua).

4.3.4.3 Estudio de la SG en relación a la expresión de AREG.

Con una n de 80 pacientes, el análisis de SG por tertiles de AREG no resultó significativo. Como se observa en la Fig.38, los grupos 2 y 3 se parecen más entre sí tanto visualmente como por las medianas de las curvas de SG (22,1 meses del grupo 2 y 25.8 meses del grupo 3) frente al grupo 1, con una mediana de 17,9 meses. Por otro lado, no conociéndose el punto de corte para la expresión de este ligando, se decidió unificar los grupos 2 y 3 con el fin de llevar a cabo un nuevo estudio de supervivencia.

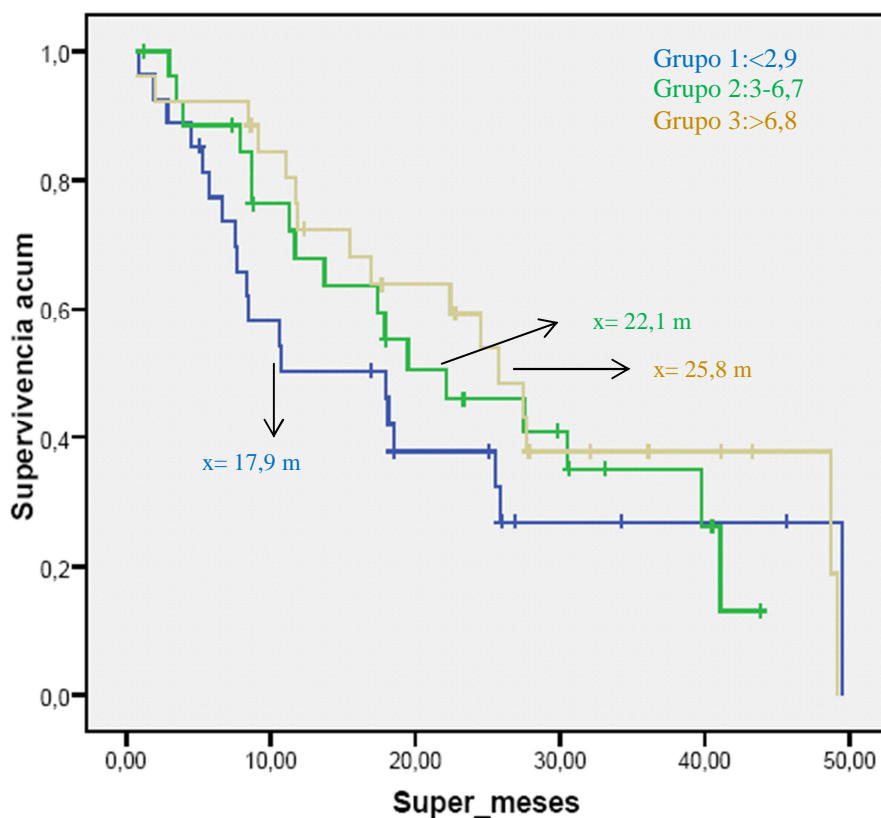


Figura 38: Curvas de Kaplan-Meier en SG según la expresión de por tertiles. Las curvas de SG de los grupos 2 (verde) y 3 (amarilla) parece que se diferencian visiblemente con respecto a la del grupo 1 (azul). Super_meses: supervivencia global (SG).

De esta forma en el grupo de pacientes con expresión de AREG <3 la estimación de la mediana de SG fue de 11,3 meses frente al otro grupo, con expresión >3 , con una estimación de la mediana de SG de 27,5 meses, con una $p=0,0665$, próxima al nivel de significación (Fig.39). El análisis de regresión COX mostró una HR de 0,5947 (IC 95% 0,3394-1,0419, $p=0,073$, NS).

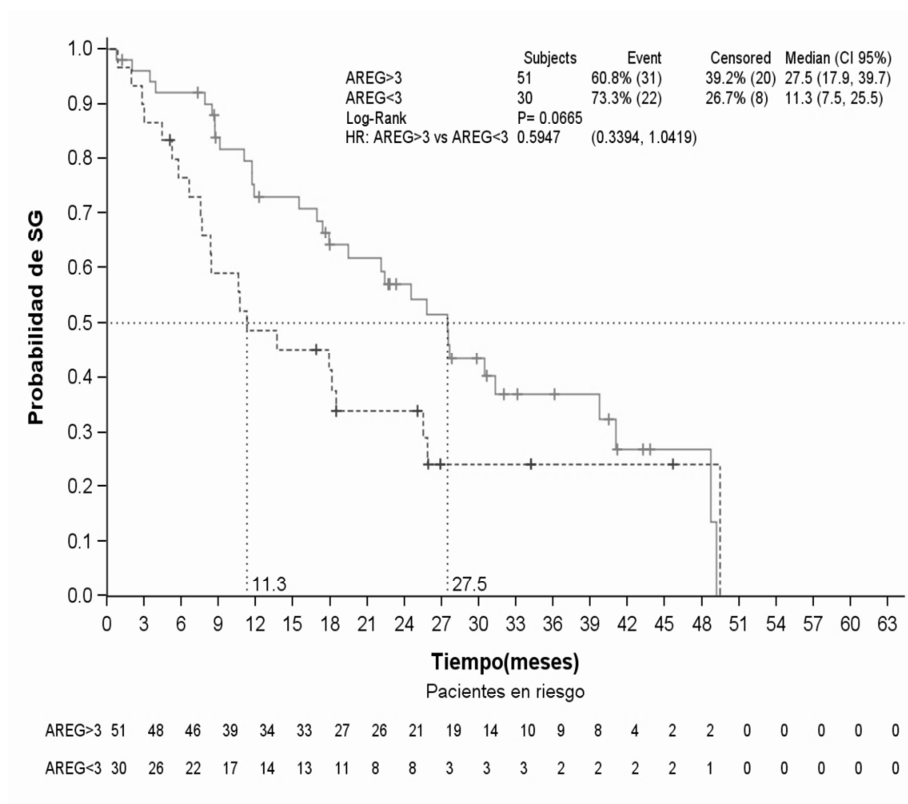


Figura 39: Curvas de Kaplan-Meier en SG según la expresión de AREG (<3/>3). Las curvas de SG del grupo de expresión >3 (continua), se diferencia visualmente del grupo de expresión <3 (discontinua).

4.3.5 EREG

La expresión de EREG en el pool control inter serie mostró un promedio de Ct de 36.57 ± 2.07 con un coeficiente de variación de 5.66% (Fig.40).

El estudio de la expresión se llevó a cabo en 82 pacientes. El resto no pudieron ser evaluados por no haberse podido extraer ARN o no tener muestra suficiente para ser analizado. La mediana de expresión de EREG fue de 4,34 (1,16-9,19) (Fig.41). La variable se categorizó por tertiles mostrándose los grupos categorizados en la Tabla 18.

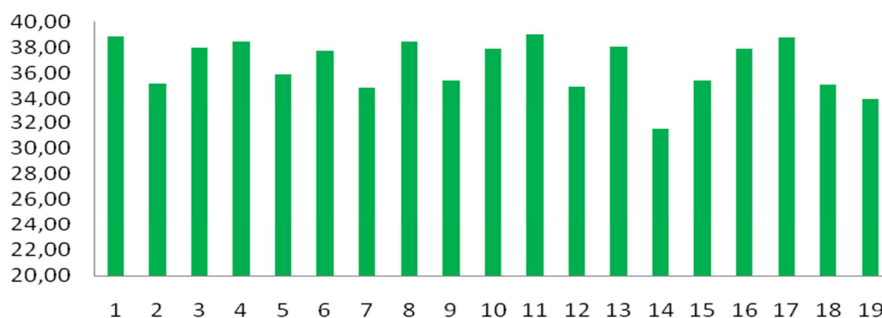


Figura 40: Expresión de EREG en el pool control. Los datos de expresión (eje de ordenadas) están en Ct y presentan la media de los duplicados o triplicados de la muestra mientras que en el eje de abscisas representamos el nº de placa.



Figura 41: Expresión de EREG en los pacientes del estudio.

	Grupo	Por tertiles	Nº Absoluto	Porcentaje (%)
EREG	1	<1,94	28	34,10
	2	1,95-6,76	27	32,90
	3	>6,77	27	32,90
	Global		82	

Tabla 18: Expresión de EREG y división por grupos de expresión por tertiles.

4.3.5.1 Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR según la expresión de EREG

Se pudieron evaluar 73 respuestas de los 82 pacientes con expresión de EREG. 24/45 (53,3%) de los pacientes con baja expresión de EREG (≤ 6), no respondieron al tratamiento frente a 10/28 (35,7%) con expresión de EREG alta (>6). El análisis entre la expresión de EREG y la respuesta no mostró una diferencia significativa ($p=0,1423$) presentando un RR de no responder para los pacientes con expresión de EREG <6 de 1,493 con IC al 95% entre 0,847-2,633 (Tabla 19).

		RESPUESTA		Total	Estadístico	Estimación del riesgo		
		RC+RP	EE+EP		p	RR	95,0% IC	
Expresión EREG	≤ 6	21 (46,7%)	24 (53,3%)	45 (100%)	0,1423, NS	1,493	0,847	2,633
	>6	18 (64,3%)	10 (35,7%)	28 (100%)		1		
Total		39 (53,4%)	34 (46,6%)	73 (100%)				

Tabla 19: Tabla de contingencia entre EREG y la respuesta. Análisis estadístico y estimación de riesgos. La respuesta está dividida en respondedores (RC+RP) y no respondedores (EE+EP).

4.3.5.2 Estudio de la SLP en relación a la expresión de EREG.

Con una n de 73 pacientes, el análisis de SLP tampoco resultó significativo ni por tertiles ni categorizando con un punto de corte. Debido a no conocerse el punto de corte de los niveles de expresión de este ligando recurrimos, como en el caso de la AREG a la visualización de las curvas de supervivencia. Las del grupo 1 y 2, al principio de la curva de supervivencia, parecen estar más juntas entre sí que la del

grupo 3 por lo que se decidió poner el punto de corte en 6 (Fig.42). De esta forma, el grupo de pacientes con expresión de EREG >6 presentó una mediana de SLP de 10,41 meses frente al otro grupo, con expresión <6 , con una mediana de SG de 7,74 meses. El análisis de regresión COX entre estos grupos mostró una HR de 0,8892 (IC 95% 0,528-1,498, 0,6589, NS) (Fig.43).

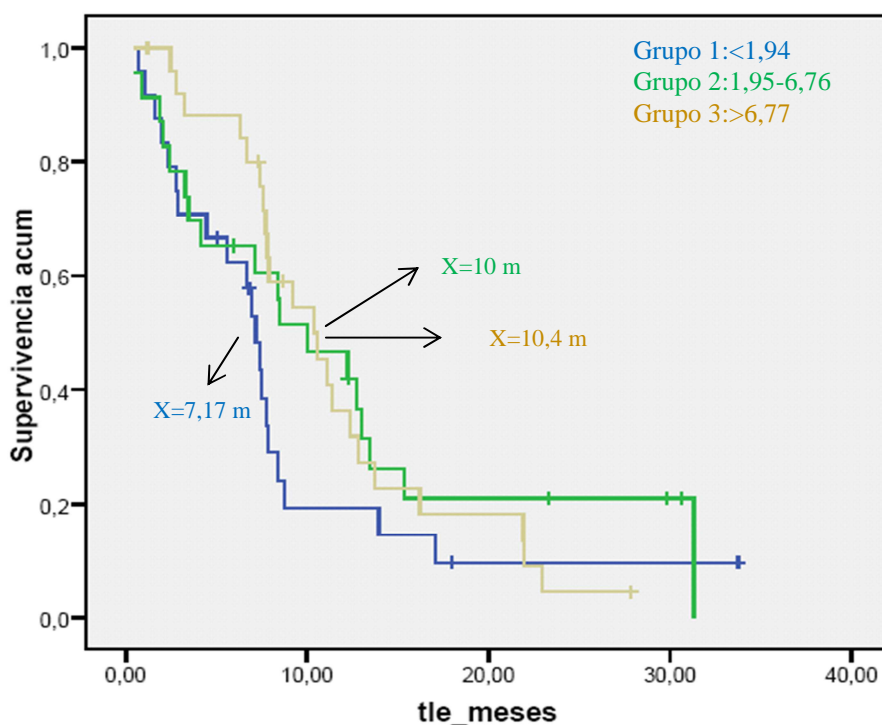


Figura 42: Curvas de Kaplan-Meier en SLP según la expresión de EREG por tertiles. Tle_meses: supervivencia libre de progresión (SLP).

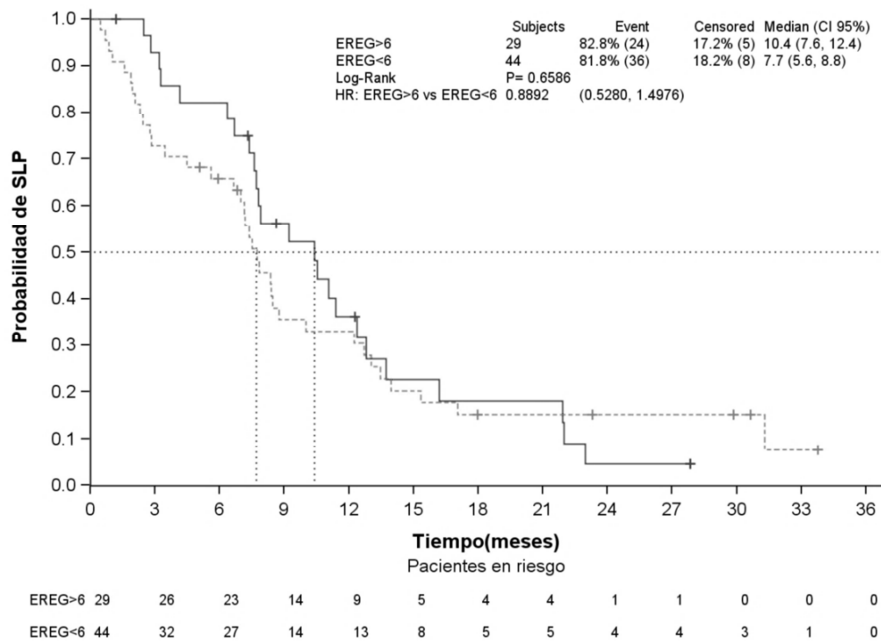


Figura 43: Curvas de Kaplan-Meier en SLP según la expresión de EREG por el punto de corte en 6. La curva del grupo de expresión >3 (continua) se cruza con la del grupo de expresión < 3 (discontinua).

4.3.5.3 Estudio de la SG en relación a la expresión de EREG

Con una n de 79 pacientes, el análisis de SG entre los grupos de expresión por tertiles no resultó significativo (Fig.44).

Visualmente y al principio las curvas de los grupos 1 y 2 permanecen juntas por lo que se hizo otro análisis utilizando el mismo punto de corte que el utilizado en el análisis de la SLP y generando dos grupos. De esta forma el grupo de pacientes con expresión de EREG >6 presentó una mediana de SG de 25,5 meses frente al otro grupo, con expresión <6 una mediana de SG de 22,1 meses, no siendo significativo el análisis ($p=0,4341$) (Fig.45). El análisis de regresión COX mostró una HR de 0,7912 (IC 95% 0,439-1,425, 0,436, NS).

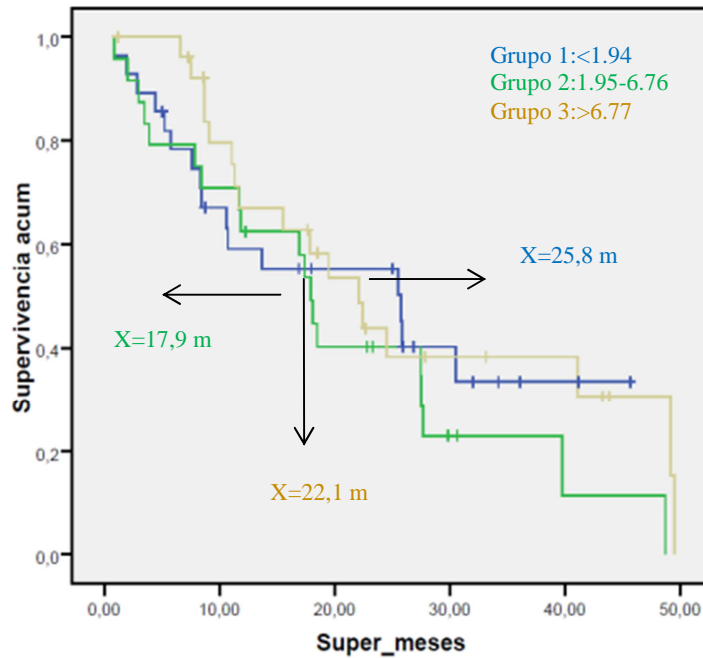


Figura 44: Curvas de Kaplan-Meier en SG según la expresión de EREG por tertiles.

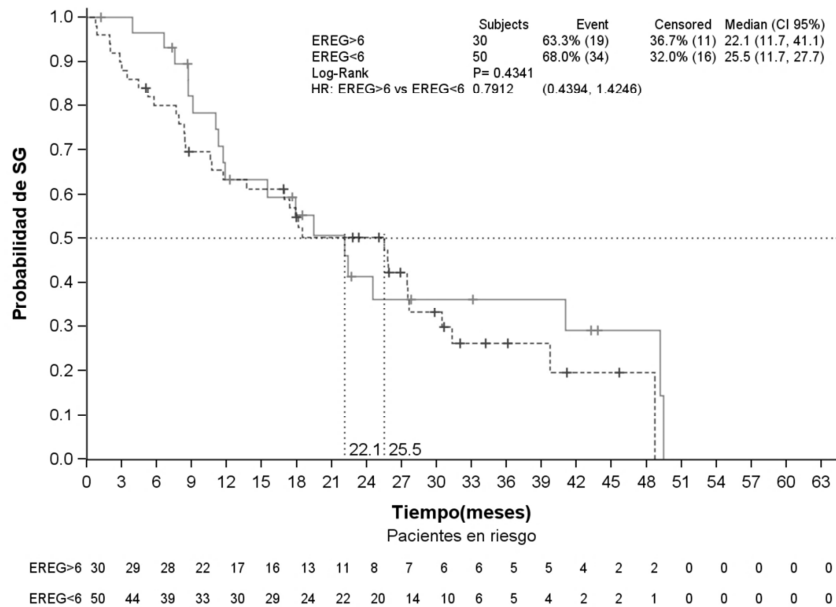


Figura 45: Curvas de Kaplan-Meier en SG según la expresión de EREG por el punto de corte en 6. Vemos que los grupos de expresión EREG <6 (discontinua) y continua) EREG >6 no se diferencian prácticamente cruzándose ambas curvas.

4.3.6 Correlación entre AREG y EREG

Los valores de expresión del mRNA de AREG y EREG por qPCR, se analizaron como variables continuas y se obtuvo una correlación de Spearman positiva igual a $R=0.48$ siendo significativa la correlación ($p<0.01^*$) (Fig.46).

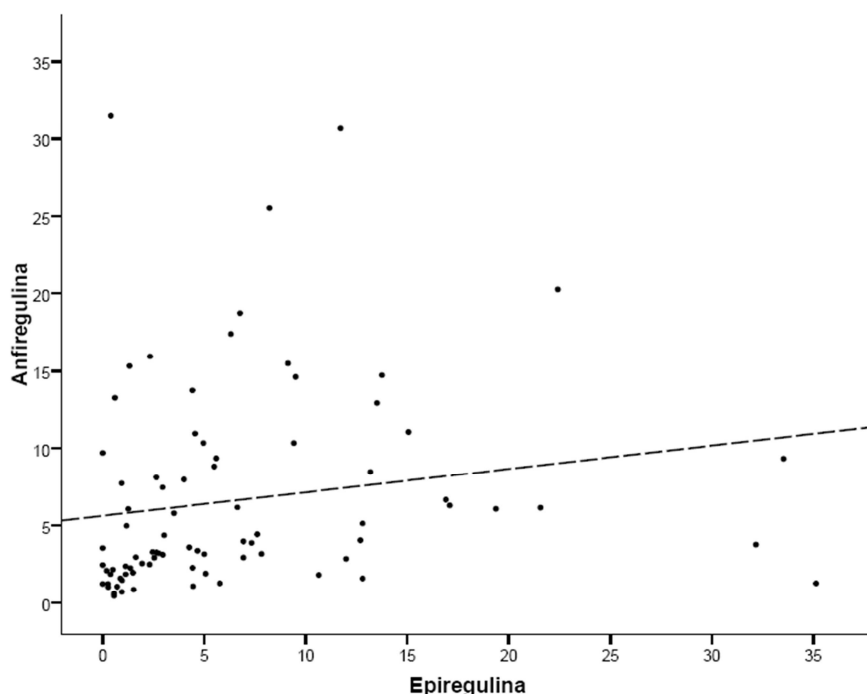


Figura 46: Gráfica de correlación entre AREG y EREG en la población de estudio. $R=0.48$, $p<0.01$.

4.4 Combinación de marcadores: *BRAF* y *AREG*

Las variable significativas en relación con la supervivencia y respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-EGFR encontradas en el estudio univariable fueron *BRAF* y *AREG*. La variable *PIK3CA* no se pudo asociar significativamente a la supervivencia ni tampoco mostró

diferencias entre las respuestas de los grupos de pacientes mutados y los nativos en este gen. Debido a estos resultados se decidió hacer un único estudio multivariable combinando con *BRAF* y AREG.

Se hicieron grupos con los pacientes combinando el estado mutacional de *BRAF* (nativos y mutados) y la expresión de AREG, categorizada en el punto de corte 3 (<3 y >3).

4.4.1 Estudio de la respuesta al tratamiento anti-EGFR

Se pudieron evaluar 74 respuestas de los pacientes con expresión de AREG y con estado mutacional de *BRAF*. En la tabla 20 mostramos las frecuencias de los datos combinados obtenidos en relación a la respuesta.

				RESPUESTA		Total
	BRAF	ANFI	n	RC+RP	EE+EP	
BRAF & AREG	Mutado	<3	6	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100%)
	Mutado	>3	2	0 (0%)	2 (100%)	2 (100%)
	Nativo	<3	23	8 (34,8%)	15 (65,2%)	23 (100%)
	Nativo	>3	43	30 (69,8%)	13 (30,2%)	43 (100%)
	Global			39 (52,7%)	35 (47,3%)	74 (100%)

Tabla 20: Tabla de frecuencias *BRAF* y AREG y la respuesta. La respuesta está dividida en respondedores (RC+RP) y no respondedores (EE+EP).

De los ocho pacientes con *BRAF* mutado, seis tenían expresión baja de AREG y dos expresión alta. Solamente un paciente con *BRAF* mutado tuvo respuesta parcial al anti-EGFR, presentando además baja

expresión de AREG. El resto de los pacientes no respondieron al tratamiento. Si nos fijamos en los *BRAF* nativos, la proporción de pacientes que responden al tratamiento es mayor si además presentan alta expresión de AREG. El análisis de contingencia entre los grupos y la respuesta mostró una diferencia significativa con una $p=0,004^{**}$.

El análisis de correlación del subgrupo de pacientes con *BRAF* nativo se representa en la tabla 21. El grupo con expresión AREG <3 presentó un RR de 2,15 (1,25-3,71), siendo significativa la diferencia ($p=0,006$).

BRAFA nativo		RESPUESTA		Total	Estadíst ico	Estimación del riesgo		
		RC+RP	EE+EP		p	RR	95,0% IC	
AREG	<3	8 (34,8%)	15 (65,2%)	23 (100%)	0,006	2,15	1,25	3,71
	>3	30 (69,8%)	13 (30,2%)	43 (100%)		1		
Total		38 (57,6%)	28 (42,4%)	66 (100%)				

Tabla 21: Tabla de contingencia con el subconjunto de pacientes *BRAF* nativos según la expresión de AREG y la respuesta. La respuesta está dividida en respondedores (RC+RP) y no respondedores (EE+EP).

4.4.2 Estudio de la SLP

Con una n de 74 pacientes, el análisis de supervivencia mostró una diferencia significativa ($p=0,022^{*}$) entre las curvas (Fig.47) con una estimación de medianas de SLP de los grupos que se muestra en la tabla 22 siendo el grupo con más supervivencia aquel con *BRAF* nativo y AREG>3, con una mediana de SLP de 11,074 meses.

GRUPO	<i>BRAF</i> + AREG	n°	Mediana SLP 95%CI (meses)
1	NATIVO & AREG <3	23	6,975 (6,311-7,639)
2	NATIVO & AREG >3	43	11,074 (6,905-15,244)
3	MUTADO & AREG <3	6	7,140 (0,911-13,370)
4	MUTADO & AREG >3	2	2,446
Global		74	

Tabla 22: Estimación de las medianas de SLP en los grupos resultantes de combinar el estado mutacional de *BRAF* y la expresión de AREG categorizada y con el punto de corte en 3.

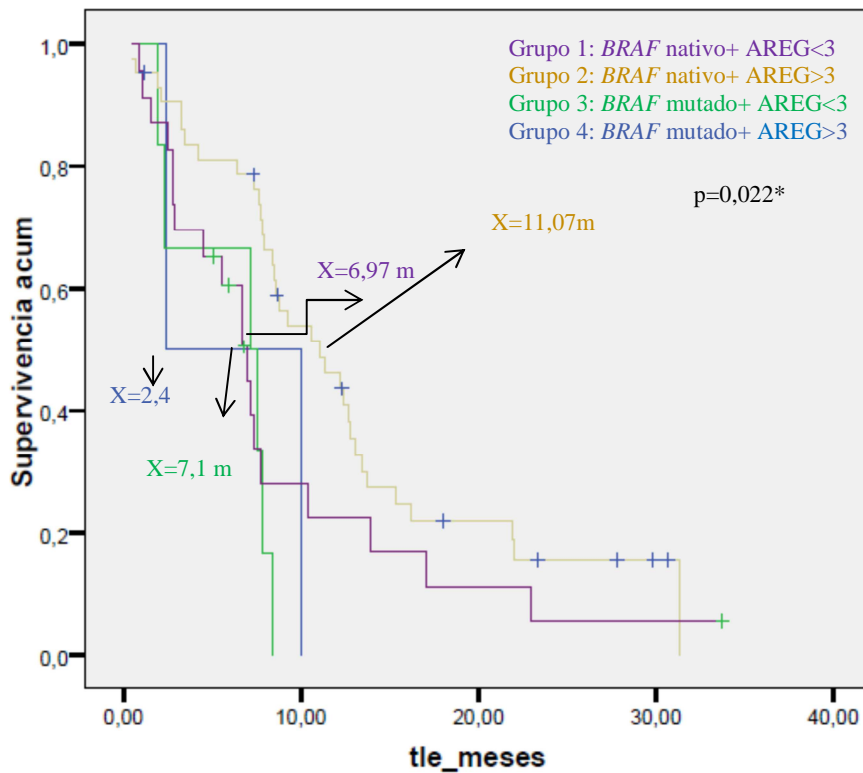


Figura 47: Curvas de Kaplan-Meier en SLP según el estado mutacional de *BRAF* y la expresión de AREG. Las curvas del grupo *BRAF* nativo y AREG>3 (amarillo) muestra una diferencia clara frente al resto de grupos. Tle_meses: supervivencia libre de progresión (SLP).

Si nos quedamos con los *BRAF* nativos, que corresponden a los grupos 1 y 2, con una n de 66, el análisis Log-Rank de supervivencia mostró una diferencia significativa de $p=0,016^*$ entre las dos curvas con medianas de SLP de 11,074 meses del grupo con expresión de $AREG>3$, grupo 2, frente a 6,975 meses del grupo con expresión de $AREG<3$, grupo 1 (Fig.48). Por otro lado, el análisis de regresión COX mostró una HR de 1,694 (IC 95% 0,957-3,001, $p=0,071$, NS).

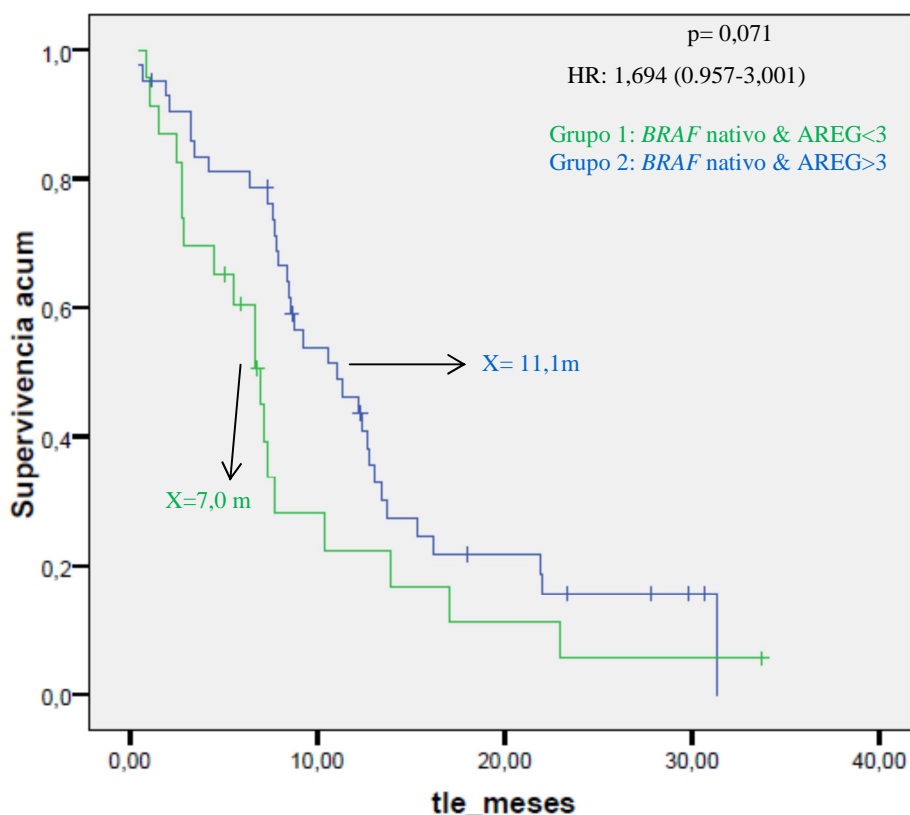


Figura 48: Curvas de Kaplan-Meier de SLP en pacientes con *BRAF* nativo según la expresión de *AREG*. Se representan las curvas de supervivencia del grupo 2, con *BRAF* nativo y $AREG>3$ (azul), frente a la del grupo 1, con *BRAF* nativo y $AREG<3$ (verde). Tle_meses: supervivencia libre de progresión (SLP).

4.4.3 Estudio de la SG

Con una n de 81 pacientes, la estimación de medianas de SG de los grupos por el método de Kaplan-Meier se muestra en la tabla 23 y las curvas de SG correspondientes en la Fig.49. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre los grupos ($p=0,0122^*$) siendo el grupo con mayor SG aquel con estado nativo de *BRAF* y expresión >3 de AREG con una mediana de SG de 27,471.

GRUPO	<i>BRAF</i> + AREG	n°	Estimación de la mediana
			Supervivencia (meses)
1	Nativo + AREG<3	24	13,719
2	Nativo + AREG>3	49	27,471
3	MUTADO + AREG<3	6	7,636
4	MUTADO + AREG>3	2	3,471
	Global	81	

Tabla 23: Estimación de las medianas de SG entre estado mutacional de *BRAF* y la expresión de AREG categorizada y con el punto de corte en 3.

Se comparó cada grupo por separado con el grupo con mayor mediana de SG, a que con *BRAF* nativo y AREG>3, resultando estadísticamente diferentes los grupos:

- *BRAF* mutado + AREG<3 ($p=0,0252$).
- *BRAF* mutado + AREG>3 ($p=0,0286$).

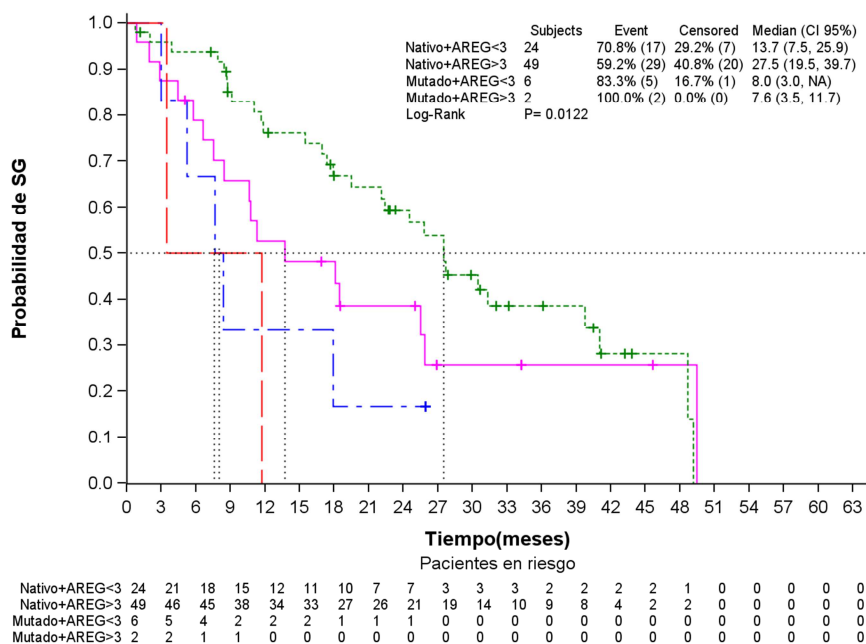


Figura 49: Curvas de Kaplan-Meier en SG según el estado mutacional de *BRAF* y la expresión de AREG. Las curvas de SG del grupo *BRAF* nativo y AREG >3 (verde) muestra una diferencia clara frente al resto de grupos.

Si lo analizamos con el grupo con *BRAF* nativo y expresión de AREG<3, el análisis Log-Rank de supervivencia no mostró una diferencia significativa ($p=0.1431$) entre los dos curvas aunque visiblemente se separan claramente (Fig.50). Como hemos destacado en la tabla 12, las medianas de SG de ambos grupos fueron de 27,5 meses para el grupo de pacientes con expresión de AREG >3 (grupo 2), frente a 13,7 meses del grupo con expresión <3, (grupo 1). El análisis de regresión COX mostró una HR de 1,580 (IC 95% 0.852-2,929) mostrando una tendencia pero sin nivel de significación ($p=0,1462$, NS).

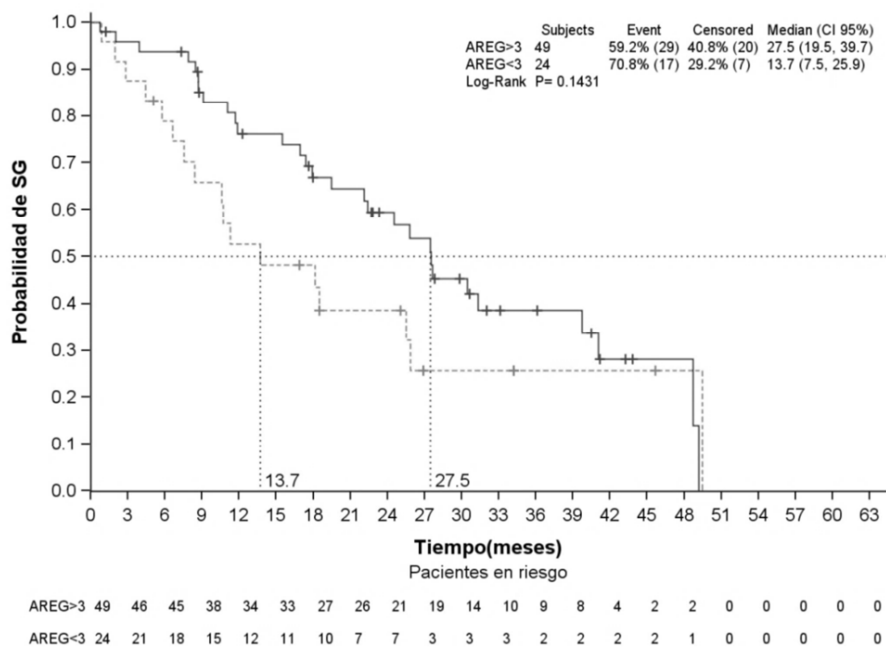


Figura 50: Curvas de Kaplan-Meier en SG en pacientes con *BRAF* nativos según la expresión de AREG. La curva de SG del grupo 2, con *BRAF* nativo y AREG >3 (continua), muestra una diferencia clara frente al grupo 1 con *BRAF* nativo y AREG <3 (discontinua).

5. DISCUSION

El tratamiento anti-EGFR, basado en anticuerpos monoclonales, se utiliza en la práctica clínica desde el año 2004 siendo su primera aplicación en CCRm. Estos fármacos tienen como diana el EGFR, bloqueándolo e inhibiendo el crecimiento tumoral así como otras funciones invasivas de la célula cancerosa que se activan a través de las vías de señalización que desencadena. Hasta el momento no se conoce el mecanismo molecular implicado en la respuesta o resistencia al tratamiento del cáncer con anticuerpos contra el EGFR.

En el año 2009 se descubrió la asociación entre las mutaciones del gen *KRAS* y la resistencia al tratamiento del CCRm a dichos fármacos, considerándolo al estado mutacional de dicho gen como factor predictivo de respuesta al tratamiento. Este hallazgo fue un hito histórico y cambió la historia de la oncología (42,55). A partir de ese momento, la Sociedad Americana de Oncología Clínica indicó que se debería determinar el estatus del gen *KRAS* en todos los pacientes con CCRm a los que se les pautara el tratamiento con anticuerpos anti-EGFR (38,56,57). Posteriormente tanto la FDA como la EMEA consideraron obligatorio el estudio del estado mutacional del gen *KRAS* para el tratamiento con anticuerpos anti-EGFR. Sin embargo, se ha visto que no todos los pacientes con *KRAS* nativo se benefician del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, indicando por tanto la implicación de otras alteraciones en los genes implicados en la vía del EGFR (58–60). Durante estos años de uso de dicho fármaco se ha propuesto otros biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta como las mutaciones en *BRAF* (44,61) y en *PIK3CA* (62), la

sobreexpresión de los ligandos del EGFR (46.48), la expresión de PTEN (64) y el número de copias del EGFR (63).

5.1 Población estudiada

El trabajo consiste en un estudio retrospectivo hecho en una población de 117 pacientes con CCRm que recibieron tratamiento en primera línea con un anti-EGFR (cetuximab o panitumumab) y con estado nativo del gen *KRAS*.

Se analiza la prevalencia de las mutaciones V600E en el gen *BRAF*, E542K, E545D, E545K/D (exón 9) y H1047R (exón 20) en el gen *PIK3CA* y la expresión (mRNA) de dos ligandos del EGFR, AREG y EREG así como el análisis de la relación con la supervivencia y la respuesta de dichos pacientes siendo la mediana de seguimiento de 15,8 con un máximo de 63 meses.

La mayoría de los tratamientos anti-EGFR estuvieron basados en cetuximab, con un 95,3% de casos, y esto es debido a que panitumumab entró más tarde en el mercado. En el grupo de pacientes, la terapia más usada con diferencia fue FOLFOX con cetuximab con 48 casos correspondiendo a un 44,8%. Además se puede decir que el oxaliplatino fue la QT más utilizada en combinación con el anti-EGFR, con más de un 60% de uso.

Si nos fijamos en la edad de los pacientes y en los porcentajes de incidencia según el sexo, se ve que el grupo de estudio representa bien a la población de pacientes con CCR ya que se trata de una enfermedad

que aumenta su incidencia mucho por encima de los 50 años. Solo el 8,5 % de los pacientes está por debajo de esta edad. Por otro lado el CCR tiene un ratio de incidencia mayor en los hombres que en las mujeres (1), al igual que en nuestro caso, con un 65,4% de hombres frente al 34,6 % de mujeres.

La expectativa de vida de estos pacientes, en mediana, se ha movido en estos años gracias a la aplicación de estas terapias, que además poco a poco se han colocado en primera línea de tratamiento de estos pacientes. En 2008 la mediana de un grupo de pacientes con *KRAS* nativo, refractarios al tratamiento con irinotecán y tratados con la combinación de cetuximab e irinotecán se situaba en 14 meses (42). La mediana de supervivencia global (SG) del grupo de pacientes fue de 20,3 meses siendo estos resultados semejantes a los descritos actualmente (18-24 meses).

El tiempo de SG es el “gold standard” para demostrar beneficio clínico de un fármaco en un ensayo clínico (65). Se trata de un criterio objetivo que no está sujeto a interpretación del investigador. En nuestro grupo de pacientes, los pacientes respondedores presentaron una mediana de SG de 20,7 meses mientras que los no respondedores presentaron una mediana de SG de 10,6 meses. Esta diferencia entre las funciones de supervivencia fue estadísticamente significativa tanto en el estudio de Log-rank ($p=0,0004$) como en el modelo no paramétrico de regresión de COX presentando mejor SG los respondedores ($p=0,0006$). Otro parámetro medible es la progresión, que se hace basándose también en técnicas de imagen y responde al avance de la enfermedad. La supervivencia libre de progresión (SLP) es el tiempo que hay entre el

inicio del tratamiento y la progresión de la enfermedad. La mediana de la SLP del grupo de pacientes se situó en 7.8 meses (4,2-12,8), progresando el 72.90% (78/99) de los pacientes frente al 7.48% (8/99) que no lo hicieron.

Otra forma de medir el beneficio clínico es mediante la respuesta, medida siguiendo los criterios RECIST, que como se ha comentado en la introducción están basados en técnicas de imagen y sirven a los médicos para decidir si continuar o dejar de usar un fármaco en un paciente. Solo la mitad del grupo de pacientes, un 49,5%, presentaron respuesta al fármaco siendo la respuesta parcial la más representada con un 45,4% del total. Si se compara con los porcentajes de respuestas publicados, se encuentra frecuencias de respuesta parecidas. En un trabajo con un grupo de pacientes pretratados con cetuximab e irinotecán, tras resistencia al tratamiento con irinotecán, la frecuencia de respuesta parcial fue de 43% (47).

5.2 *BRAF*

El gen *BRAF*, al igual que *KRAS*, codifica para proteínas que actúan en la vía de señalización Ras-Raf-MAPK. B-Raf. Como primer efector de K-Ras, fue uno de los primeros posibles biomarcadores que se postuló para ser utilizado como pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento anti-EGFR.

La prevalencia de la mutación V600E en *BRAF*, en las publicaciones varía en torno al 5-15% de pacientes con CCRm, según la población de estudio, sus características y la técnica utilizada para la determinación.

En este trabajo se ha encontrado que un 7,6% de los pacientes presentaban la mutación de *BRAF*. El resultado fue el mismo por las dos técnicas analizadas. Ambas están basadas en la misma técnica, Taqman®, y teniendo una buena sensibilidad. Por otra parte, hay que tener en cuenta que nuestra población es nativa para *KRAS* y debido al hecho de que estas mutaciones son excluyentes y en población nativa esperaríamos un porcentaje mayor de mutación de *BRAF* que en población nativa. Nuestra prevalencia de mutaciones en *BRAF* coincide con la de Richman SD y col (66) que encuentran un 7.9% y son superiores a los publicados por de Rook W y col, con una prevalencia del 4,7% (67) e inferior a la encontrada en Di Nicolantonio y col (9) aunque algunos de estos trabajos están hechos sin seleccionar la población de *KRAS*.

En muchos de estos trabajos se han hecho además estudios de la implicación de la mutación V600E como factor pronóstico y predictivo en el CCRm.

No hay duda de que dicha mutación confiere un peor pronóstico de la enfermedad metastásica, siendo esto confirmado tanto en estudios como en ensayos clínicos en primera línea de tratamiento como en otras líneas (61,66,68). Estos datos los confirmamos en nuestro estudio mostrando una diferencia significativa entre las SG de los pacientes *BRAF* mutado y nativo, tanto por el modelo de regresión de COX ($p=0.0103$) como por el log-rank ($p=0,0073$), presentando mejor SG los pacientes con *BRAF* nativo. En cuanto a la SLP, *BRAF* también es un factor significativo para explicar la diferencias en progresión entre los casos mutados y los nativos mostrando diferencias significativas en el

modelo de regresión de COX (una $p=0.0113$) y en el log-rank ($p=0,0084$).

La presencia de mutaciones de *BRAF* se ha correlacionado con la resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR tanto en estudios como en ensayos clínicos (38,39,44,61). Por otra parte hay un ensayo clínico en primera línea de tratamiento que no encuentra esta relación significativa (69). Nuestros pacientes *BRAF* mutados mostraron un nivel menor de respuestas (12.5%) frente a los *BRAF* nativos (52.3%). Por otra parte, solo 1 paciente de ocho mutados respondió parcialmente al tratamiento. El análisis de la presencia de mutación en *BRAF* y la respuesta al tratamiento mostró una tendencia con una diferencia casi significativa ($p=0.059$) con un RR de 1.835 (IC al 95% entre 1.302- 2.586) de los pacientes con *BRAF* mutados frente a los nativos. Di Nicolantonio et al, así como en otros ensayos clínicos en primera línea de tratamiento (38,39,44), encontraron también que los pacientes con *BRAF* mutado no respondían al tratamiento con cetuximab o panitumumab. El análisis actualizado de los estudios clínicos Crystal y OPUS (39), con pacientes tratados y sin tratar, han mostrado que la presencia de mutaciones en *BRAF* confieren un peor pronóstico a los pacientes pero su significado predictivo para cetuximab no se pudo establecer ni tampoco se pudo excluir. El pequeño tamaño del grupo de mutados de nuestro estudio podría afectar claramente en el poder estadístico y puede ser la causa de la no significación aunque no vemos datos diferentes en ensayos clínicos con mayor número de pacientes. Quizá el hecho de que las mutaciones en *BRAF* son de muy mal pronóstico pueda interferir en la significatividad de los estudios sobre la respuesta.

5.3 *PIK3CA*

Las mutaciones en el gen *PIK3CA* se han sugerido también como biomarcadores de resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. El papel del estatus mutacional de este gen todavía hoy no está claro y los resultados publicados son conflictivos. La prevalencia de mutaciones de *PIK3CA* en nuestro grupo de pacientes fue de 10 %, presentándose en 10 pacientes; de ellas 7 se encontraron localizadas en el exón 9 (E542K y E545K/D) y 3 en el exón 20 (H1047R). Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Saridaki Z y col (59), por Prenen H y col (70), por Pentheroudakis G y col (71) y contrarios a los publicados por Sartore-Bianchi y col (62) y por Mao C y col (60) los cuales encuentra más mutaciones en el exon 20 que en el 9. La localización de las mutaciones parece ser que es importante; según unos algunos autores solo las mutaciones en el exon 20 se correlacionarían con la respuesta y la supervivencia frente al tratamiento anti-EGFR siendo un marcador de resistencia (8,11,24).

La valoración de la respuesta en relación al estado de *PIK3CA* en nuestro grupo de estudio, ha dado como resultado que no hay asociación estadísticamente significativa. De hecho las proporciones de respuesta en ambos grupos de pacientes (exon 9 y exon 20) resultan igual. Estos datos coinciden por los publicados recientemente por Pentheroudakis G y col (71) los cuales tampoco encuentran diferencias significativas en la supervivencia ni en la respuesta de los pacientes con o sin mutaciones de *PIK3CA* y *KRAS* nativo. Por el contrario, en un trabajo posterior de De Rook y col (67), hecho en una cohorte grande de pacientes, en el cual separan los pacientes mutados en el exon 9 de

los del exon 20 encuentra que los pacientes tratados con cetuximab con tumores con mutación en el exon 20 de *PIK3CA* tenían peor supervivencia. Las mutaciones en el exon 9 no tenían efecto sobre la respuesta considerando las mutaciones en el exon 20 como de resistencia al tratamiento. Estos hechos se podrían explicar por la localización de dichos exones. El exón 9 corresponde al dominio helicoidal de la molécula mientras que el 20 al dominio quinasa. En nuestros casos, que son pocos, si comparamos las medianas de SLP de ambos subgrupos de mutados, podemos ver que no hay diferencias en las medianas. No así en cuanto a SG, en la que parece que los mutados en el exón 9 podrían tener cierto beneficio mientras que aquellos mutados en el exón 20 se comportarían como los nativos. Ante tal discrepancia de datos, se ve que se necesitan estudios más completos, independientes y sobretudo más extensos acerca de dicho biomarcador. En la actualidad se están haciendo ensayos clínicos y muy pronto tendremos más datos acerca del papel que juega el estado de *PIK3CA* en la resistencia frente a dichas dianas terapéuticas.

5.4 Anfirregulina y epirregulina

Los ligandos del EGFR AREG y EREG, no se expresan en tejido normal de colon pero aumenta su expresión en los adenomas y carcinomas. Estos resultados sugieren un papel de la AREG y EREG en el crecimiento de los tumores y en la reparación de la mucosa del colon (49). El estudio Khambata F y col sobre los perfiles de expresión en pacientes con CCRm tratados con cetuximab, hechos con la plataforma de Affymetrix, encontraron que los ligandos AREG y EREG estaban altamente expresados y se asociaban a la respuesta al tratamiento con

cetuximab indicando un papel oncogenico autocrino de la señalización del EGFR (48). Estos resultados fueron confirmados por Teipar S y col (73). Los pacientes de nuestro estudio mostraron una sobreexpresión de AREG y de EREG con respecto al tejido normal de colon situándose la mediana de expresión en 3,88 y 4,34 respectivamente.

En este trabajo, se ha demostrado también, al igual que Jacobs B y col (47), que es técnicamente posible medir la expresión de los ligandos del EGFR en muestras de tejido parafinadas. En nuestro ensayo, para la AREG se consiguió un CV interensayo de 5,89% mientras que para la EREG fue de 5,66%.

Utilizando un punto de corte para la AREG, marcado por la separación por tertiles y la observación de las curvas de supervivencia, el análisis entre la expresión de AREG y la respuesta mostró una diferencia significativa presentando los pacientes con baja expresión un riesgo relativo alto a no responder al tratamiento. En relación a la supervivencia solo para la SLP se observó una clara significación mientras que para la SG se observó una tendencia, ambas a favor de los de mejor supervivencia para los de mayor expresión. Estos datos están de acuerdo con los publicados por Jacobs B (47), con Saridaki Z (59) y con Pentheroudakis G y col (71) mientras que en el trabajo publicado por Kuramochi (46), por el contrario, no se ven estas observaciones.

En relación con la EREG el estudio entre expresión y supervivencia así como de respuesta no fue significativo, aunque se observan tendencias siendo el riesgo relativo de un paciente con baja expresión peor que uno con alta expresión.

En relación a la correlación entre ambos genes, en nuestro estudio hemos visto una correlación positiva y significativa entre ambos genes con un índice de correlación de Spearmann's de $R > 0.4$ estos datos están de acuerdo con los publicados por Khambata et al (48) y por Pentheroudakis G y col (71).

Los resultados del estudio combinado de biomarcadores se nos muestran que los pacientes con tumores *KRAS* y *BRAF* nativos y con alta expresión de AREG responden mejor al tratamiento anti-EGFR siendo significativa esta relación ($p = 0,006$). Esta mejor respuesta se ve reflejada en las curvas de SLP y en la SG aunque no se alcanza en ninguno de estos casos diferencias significativas.

Nuestro estudio confirma los datos publicados en relación al significado pronóstico de las mutaciones de *BRAF* confirmando su carácter de factor de mal pronóstico. Por otra parte se confirma el valor pronóstico de la expresión del RNAm de AREG en pacientes *KRAS* nativos para la respuesta y la SLP. Por último se nos plantea la hipótesis de que la expresión de AREG pueda ser un factor predictivo en el tratamiento en pacientes *KRAS* y *BRAF* nativos, con la necesidad de confirmar esto con ensayos de doble brazo, con pacientes tratados y sin tratar.

Debido a las actuales publicaciones en los que consideran a *NRAS* como biomarcador predictivo de tratamiento anti-EGFR, sería interesante analizar en nuestra serie de pacientes las mutaciones descritas en este gen. A la vez, en las guías de práctica clínica se tiene en consideración ahora también el estudio de otras mutaciones en el

gen *KRAS*, mucho menos frecuentes que las analizadas en nuestros pacientes, pero también relacionadas con la respuesta a los tratamientos anti-EGFR por lo que su estudio en esta muestra de pacientes también sería interesante considerarlo. Por otra parte, las características de los pacientes y el régimen de tratamiento de nuestro estudio fue el establecido para el CCRm por lo tanto, nuestros resultados pueden ser útiles para la clínica diaria.

6. CONCLUSIONES

1 Población estudiada:

- La mediana de SG de nuestro grupo de pacientes, formado por 107 individuos, fue de 20,3 meses y la de SLP de 8,4 meses.
- El 49,5% de los pacientes presentaron respuesta al tratamiento anti-EGFR siendo la respuesta parcial la más representativa, con un 45,4% del total.
- La diferencia entre la supervivencia de los pacientes respondedores y la de los no respondedores fue significativa siendo de 27,7 meses para aquellos y de 10,6 meses para estos.

2 *BRAF*:

- La prevalencia de la mutación V600E en *BRAF* fue de 7,7 % en nuestra serie de pacientes.
- *BRAF* es un factor de mal pronóstico tanto a nivel de SLP como a nivel de SG siendo ambas diferencias significativas.
- El análisis de la presencia de mutación en *BRAF* y la respuesta al tratamiento mostró una diferencia rozando el nivel de significación presentando resistencia aquellos mutados.

3 *PIK3CA*:

- La prevalencia de las mutaciones en *PIK3CA* fue del 10 % siendo la mayoría en el exón 9.
- No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre el estado mutacional de *PIK3CA* y la respuesta.
- Tampoco se han encontrado diferencias en las curvas de SLP en los pacientes con *PIK3CA* mutados y nativos.

- En relación a la SG los pacientes mutados en el exón 9 tuvieron mejor SG que los pacientes mutados en el exón 20, que se comportaron como los nativos.

4 Anfirregulina:

- La expresión de anfirregulina resultó más elevada en los pacientes que en el tejido normal.
- Los pacientes con baja expresión de anfirregulina, menor a 3, tuvieron peor respuesta y SLP que los de expresión por encima de 3. En cuanto a la SG hubo una tendencia observándose también que los pacientes con menor expresión tienen peor supervivencia que los de expresión por encima de 3.
- Nuestro estudio confirma el valor pronóstico de la expresión de anfirregulina en pacientes con *KRAS* y *BRAF* nativos.

5 Epirregulina:

- Epirregulina resultó en todos los pacientes, al igual que la anfirregulina, con expresión más elevada en los pacientes que en tejido normal.
- En relación a la epirregulina, a pesar de la tendencia observada, el análisis de la supervivencia y la respuesta no fue significativa.

6 Análisis multivariante:

- El análisis multivariable demostró que los pacientes con *KRAS* nativo, *BRAF* nativo y alta expresión de anfirregulina tienen mejor respuesta al tratamiento anti-EGFR siendo significativo el análisis. En cuanto a la supervivencia solo se observó una tendencia a serlo.
- En cuanto a la utilización de anfirregulina como biomarcador predictivo este trabajo es generador de hipótesis para futuros trabajos realizados con un número mayor de pacientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2008 [Internet]. <http://globocan.iarc.fr/>
2. Harrison. Principios de Medicina Interna. 14th ed. Mc Graw Hill; 1998.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Apr; 55(2): 74–108.
4. Russo A, Rizzo S, Bronte G, Silvestris N, Colucci G, Gebbia N, et al. The long and winding road to useful predictive factors for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal carcinoma: the KRAS/BRAF pathway. *Oncology*. 2009; 77 Suppl 1: 57–68.
5. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1; 319 (9): 525–32.
6. Aspinall, Taylor-Robinson. Carcinogenesis. Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health. 2003.
7. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007 Mar 8; 446 (7132): 153–8.
8. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007 Nov 16; 318 (5853): 1108–13.
9. Perkins AS, Stern DF. Biología molecular del cáncer: oncogenes. *Cáncer Principios y práctica de Oncología*. 5th ed. 2000. p. 79–102.
10. Sundaram M. RTK/Ras/MAPK signaling. WormBook [Internet]. 2006; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19739/>.
11. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*. 1982 Nov 11; 300 (5888): 143–9.
12. KRAS Gene - GeneCards. <http://www.genecards.org>

13. Feliu Batle J, Casado Sáenz E. Tumores digestivos (II): cáncer de colon. Tratado de Medicina Paliativa 2a edición. Ed. Médica Panamericana; 2007.
14. Andreyev HJN, Norman AR, Clarke PA, Cunningham D, Oates JR. Kirsten ras Mutations in Patients With Colorectal Cancer: the Multicenter “RASCAL” Study. *J Natl Cancer Inst.* 1998 May 6; 90(9): 675–84.
15. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 1984 Jun 31; 309 (5967): 418–25.
16. Yamada M, Ichikawa Y, Yamagishi S, Momiyama N, Ota M, Fujii S, et al. Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Apr 15; 14(8): 2351–6.
17. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Jun; 31(6): 637–43.
18. Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, et al. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2004 Aug; 17(8): 895–904.
19. Ozgöl C, Karaöz E, Erdoğan D, Dursun A. Expression of epidermal growth factor receptor in normal colonic mucosa and in adenocarcinomas of the colon. *Acta Physiol Hung.* 1997 1998; 85(2): 121–8.
20. Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J.* 1989 Feb; 8(2): 421–7.
21. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. NEW EMBO MEMBERS’ REVIEW. *EMBO J.* 2000 Jul 3; 19(13): 3159–67.
22. Stern DF. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res.* 2000; 2(3): 176–83.

23. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. 2001 Sep; 37 Suppl 4: S16–22.
24. Benson AB 3rd, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen Y-J, Choti MA, Cooper HS, et al. Metastatic colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2013 Feb 1; 11(2): 141–152; quiz 152.
25. Cancer de colon | Sobrevivir a un tumor [Internet]: <http://tumor-de.blogspot.com.es/2012/02/cancer-de-colon.html>.
26. Greene FL. *AJCC Cancer Staging Atlas*: Editors, Frederick L. Greene et al. Springer London, Limited; 2006. 372 p.
27. Manich CS, Macarulla Mercadé T, Ramos Pascual F. *Cáncer colorrectal*. Arán Ediciones; 2007. 130 p.
28. Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005; 103(12): 2435–46.
29. Ácido folínico [Internet]. <http://es.wikipedia.org>.
30. Lockhart AC, Lockhart C, Berlin JD. The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Semin Oncol*. 2005 Feb; 32(1): 52–60.
31. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecán in irinotecán-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22; 351(4): 337–45.
32. Jonker DJ, O’Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au H-J, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007 Nov 15; 357(20): 2040–8.
33. Wilke H, Glynne-Jones R, Thaler J, Adenis A, Preusser P, Aguilar EA, et al. Cetuximab plus irinotecán in heavily pretreated metastatic colorectal cancer progressing on irinotecán: MABEL Study. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 20; 26(33): 5335–43.

34. Serrano Blanch, R, Gómez España, MA, Aranda Aguilar, E. Cáncer colorrectal (CCR). *Biología molecular para clínicos de los principales tumores*. 2005. p. 53–69.
35. Lim S-B, Jeong S-Y, Lee MR, Ku J-L, Shin Y-K, Kim WH, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2004 Nov; 19(6): 533–7.
36. McKay J., Murray L., Curran S, Ross V., Clark C, Murray G., et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer*. 2002 Nov; 38(17): 2258–64.
37. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1; 26(10): 1626–34.
38. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecán, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011 May 20; 29(15): 2011–9.
39. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012 Jul; 48(10): 1466–75.
40. Vale CL, Tierney JF, Fisher D, Adams RA, Kaplan R, Maughan TS, et al. Does anti-EGFR therapy improve outcome in advanced colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct; 38(6): 618–25.
41. Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 15; 66(8): 3992–5.

42. Lièvre A, Bachet J-B, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 20; 26(3): 374–9.
43. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet J-B, Lecomte T, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR Status in Determining Benefit From Cetuximab Therapy in Wild-Type KRAS Metastatic Colon Cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10; 27(35): 5924–30.
44. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10; 26(35): 5705–12.
45. *PIK3C2A* Gene - GeneCards. <http://www.genecards.org>
46. Kuramochi H, Nakajima G, Kaneko Y, Nakamura A, Inoue Y, Yamamoto M, et al. Amphiregulin and Epiregulin mRNA expression in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *BMC Cancer*. 2012 Mar 13; 12:88.
47. Jacobs B, Roock WD, Piessevaux H, Oirbeek RV, Biesmans B, Schutter JD, et al. Amphiregulin and Epiregulin mRNA Expression in Primary Tumors Predicts Outcome in Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 20; 27(30): 5068–74.
48. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras Mutation Status Predict Disease Control in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1; 25(22): 3230–7.
49. Nishimura T, Andoh A, Inatomi O, Shioya M, Yagi Y, Tsujikawa T, et al. Amphiregulin and epiregulin expression in neoplastic and inflammatory lesions in the colon. *Oncol Rep*. 2008 Jan; 19(1): 105–10.
50. *AREG* Gene and *EREG* Gene - GeneCards. <http://www.genecards.org>

51. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013 Sep 12; 369(11): 1023–34.
52. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006 Enero; 363(1–2): 32–47.
53. Housekeeping [Internet]. Wikipedia. <http://es.wikipedia.org>.
54. PSMB4 [Internet]. Wikipedia. <http://es.wikipedia.org>.
55. Winer E, Gralow J, Diller L, Karlan B, Loehrer P, Pierce L, et al. Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 10; 27(5): 812–26.
56. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20; 27(12): 2091–6.
57. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Sep; 6(9): 519–27.
58. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PloS One*. 2009; 4(10): e7287.
59. Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in ≥ 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PloS One*. 2011; 6(1): e15980.

60. Mao C, Zhou J, Yang Z, Huang Y, Wu X, Shen H, et al. KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations and the Loss of PTEN Expression in chinese patients with colorectal cancer. PLoS ONE 7(5): e36653. doi:10.1371/journal.pone.0036653.
61. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2009 Aug 4; 101(3): 465–72.
62. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res. 2009 Mar 1; 69(5): 1851–7.
63. Loupakakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, et al. PTEN Expression and KRAS Mutations on Primary Tumors and Metastases in the Prediction of Benefit From Cetuximab Plus Irinotecán for Patients With Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2009 Jun 1; 27(16): 2622–9.
64. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Copy Number and Clinical Outcome of Metastatic Colorectal Cancer Treated With Panitumumab. J Clin Oncol. 2007 Aug 1; 25 (22): 3238–45.
65. Pazdur R. Endpoints for assessing drug activity in clinical trials. The oncologist. 2008; 13 Suppl 2: 19–21.
66. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, Elliott F, Daly CL, Meade AM, et al. KRAS and BRAF Mutations in Advanced Colorectal Cancer Are Associated With Poor Prognosis but Do Not Preclude Benefit From Oxaliplatin or Irinotecán: Results From the MRC FOCUS Trial. J Clin Oncol. 2009 Dec 10; 27(35): 5931–7.
67. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilak G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010 Aug; 11(8): 753–62.

68. Van Cutsem E, Lang I, Folprecht G, Nowacki M, Barone C, Shchepotin I, et al. Cetuximab plus FOLFIRI: Final data from the CRYSTAL study on the association of KRAS and BRAF biomarker status with treatment outcome. *J Clin Oncol Meet Abstr*. 2010 May; 28 (15_suppl 3570).
69. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet*. 2011 Jun 18; 377(9783): 2103–14.
70. Prenen H, Schutter JD, Jacobs B, Roock WD, Biesmans B, Claes B, et al. PIK3CA Mutations Are Not a Major Determinant of Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 May 1; 15 (9): 3184–8.
71. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatsas G, Papakostas P, Makatsoris T, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013; 13: 49.
72. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2009 Jan; 20(1): 84–90.
73. Tejpar S, Peeters M, Humblet Y, Vermorken J., de Hertogh G, De Roock W, et al. Relationship of efficacy with KRAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecán-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecán (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J Clin Oncol*. 2008; 26 (15s).